



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Onze referentie
W15-12

Uw referentie
-

Briefkenmerk
CCD-2016-082

Datum **31 MRT 2016**
Betreft Wob-besluit W15-12

Geachte mevrouw 

In uw email van 7 december 2015 heeft u met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) bij de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) om informatie verzocht met betrekking tot de volgende projectvergunningen:

- 2015213 – Vaardigheidstraining en onderwijsprogramma voor medewerkers, stagiairs en onderzoekers bij een proefdiercentrum¹;
- 2015123 – De invloed van hygiënestatus op de energie- en eiwitbehoefte van varkens;
- 2015135 – Een in vitro baarmoedermodel voor toxicologisch onderzoek;
- 2015138 – Ontwikkeling van een vaccin tegen Respiratoir Syncytiaal Virus (RSV);
- 2015143 – Ontwikkeling van nieuwe vaccins tegen twee veelvoorkomende kankers: prostaatkanker en darmkanker;
- 2015152 – Bepalen van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica;
- 2015156 – Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding;
- 2015157 – Evaluatie van het infectieverloop van een titanium implantaat;
- 2015159 – Plaatselijke afgifte van medicijnen voor het herstel van botbreuken en -defecten en voor het verbeteren van de verankering van implantaten in bot;
- 2015169 – Registratie van een geneesmiddel voor de verlichting van ontsteking en pijn.

¹ In uw verzoek van 7 december 2015 verwijst u voor wat betreft deze vergunning naar NTS2015123. Dit moet echter NTS2015213 zijn.

De ontvangst van uw verzoek is op 9 december 2015 schriftelijk (per e-mail verzonden) aan u bevestigd.

Opschorting en verdaging

Met de brief van 22 december 2015 – op 22 december 2015 per mail aan u verzonden – is u kenbaar gemaakt dat de termijn om te beslissen op uw Wob-verzoek met vier weken is verdaagd. Op 14 januari 2016 is per email aangegeven dat de beslistermijn met vier weken is opgeschort, vanwege het vragen van zienswijzen aan derden. Daarnaast is bij brief van 26 februari 2016 – op 26 februari 2016 per mail aan u verzonden – aangegeven dat de beslistermijn met vier weken is opgeschort, vanwege het vragen van een zienswijze aan derden. Hierdoor is de uiterste beslistermijn verschoven naar 29 maart 2016.

Wettelijk kader

Uw verzoek valt (deels) onder de reikwijdte van de Wob.

Inventarisatie documenten

Op basis van uw verzoek is een groot aantal documenten aangetroffen. De documenten zijn per projectvergunning genummerd en opgenomen in een bijbehorende inventarislijst. De inventarislijsten worden als onderdeel van de (eventueel) te openbaren documenten bijgevoegd. In de inventarislijsten wordt per document aangegeven of het document geheel wordt geopenbaard, gedeeltelijk wordt geopenbaard of volledig wordt geweigerd. Hierbij worden tevens de wettelijke weigeringsgronden aangegeven.

Zienswijzen

Bij de openbaarmaking van de documenten zijn derde belanghebbenden betrokken en zij zijn in de gelegenheid gesteld om over de eventuele openbaarmaking van de documenten een zienswijze te geven. De ingediende zienswijzen zijn meegenomen bij de behandeling van dit besluit.

Besluit

Hierbij besluiten wij een deel van de door u gevraagde informatie te openbaren. Voor het overige wordt de door u gevraagde informatie niet openbaar gemaakt. Voor de motivering verwijzen wij u naar het onderdeel 'Overwegingen' in dit besluit en de bijgevoegde inventarislijsten per vergunning.

Reeds openbare documenten

Van iedere verleende vergunning wordt een niet-technische samenvatting (hierna: NTS) op de website van de CCD (www.centralecommissiedierproeven.nl) gepubliceerd. Deze informatie is daarmee reeds openbaar. Per projectvergunning staat in de inventarislijst aangegeven welk document de NTS betreft. De Wob is niet van toepassing op informatie die reeds openbaar is, waardoor uw verzoek voor wat betreft deze documenten niet onder de reikwijdte van de Wob valt.

Overwegingen

Op grond van artikel 3 lid 5 van de Wob wordt een verzoek om informatie ingewilligd met inachtneming van hetgeen is bepaald in de artikelen 10 en 11 van de Wob.



Het recht op openbaarmaking op grond van de Wob dient uitsluitend het publieke belang van een goede en democratische bestuursvoering. Het komt iedere burger in gelijke mate toe. Daarom kan ten aanzien van de openbaarheid geen onderscheid worden gemaakt naar gelang de persoon of de bedoeling of belangen van de verzoeker. Bij de te verrichten belangenafweging worden dan ook betrokken het algemene belang bij openbaarmaking van de gevraagde informatie en de door de weigeringsgronden te beschermen belangen, maar niet het specifieke belang van de verzoeker.

Evenmin kent de Wob een beperkte vorm van openbaarmaking. Dit betekent dat openbaarmaking van de gevraagde documenten uitsluitend aan u op grond van de Wob niet mogelijk is. Indien wij u de betreffende documenten verstrekken, moeten wij deze ook aan anderen geven indien zij daarom verzoeken. In dat licht vinden de onderstaande belangenafwegingen dan ook plaats.

De vergunninghouder bij NTS2015138 en NTS2015143 heeft in een zienswijze betoogt dat de Wob als algemene openbaarmakingsregeling dient te wijken voor de bijzondere openbaarmakingsregelingen die volgen uit artikel 39 TRIPs, de Dierproevenrichtlijn en de Wod.

De CCD is van mening dat de Wob wel degelijk van toepassing is, nu uit de Wod volgt dat de Wob van toepassing is. Uit de Memorie van toelichting wijziging wet op de dierproeven volgt (op pagina 11): *"Een dergelijke goedkeuring van een project is een besluit in de zin van de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb). Tegens een besluit in de zin van de Awb staat bezwaar en beroep open en is de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) van toepassing."* Op pagina 14 van de genoemde Memorie van Toelichting valt te lezen: *"Nu slechts de CCD belast is met de vergunningverlening voor projecten, is de CCD ook belast met de afhandeling van bezwaar- en beroepschriften en Wob-verzoeken, waardoor deze op een eenduidige wijze behandeld kunnen worden."*

De vergunninghouder heeft aangegeven dat de in artikel 39 TRIPs bedoelde bescherming directe werking heeft in die zin dat deze wordt geacht te zijn geïncorporeerd in de Dierproevenrichtlijn en daarmee in de Wod. De Dierproevenrichtlijn (richtlijn 2010/63/EU) is echter geïmplementeerd in de herziene Wod en zoals hiervoor reeds is gebleken, verklaart de Wod de Wob van toepassing.

Voor zover artikel 39 TRIPs al van toepassing zou zijn, bepaalt lid 1 van dit artikel dat de deelnemende staten, bij het waarborgen van doeltreffende bescherming tegen oneerlijke concurrentie zoals bepaald in artikel 10bis van het Verdrag van Parijs, niet openbaar gemaakte informatie zullen beschermen tegen oneerlijke concurrentie overeenkomstig het tweede lid. Aan deze waarborg komt de Wob tegemoet middels de weigeringsgronden van artikel 10 en 11.

Door een aantal derde belanghebbenden is voorts aangegeven dat de niet-technische samenvatting (NTS) volstaat voor wat betreft de openbaarmaking van de bij de vergunningen behorende documenten. Uit de Memorie van toelichting van de Wob volgt dat bijzondere openbaarmakingsregels in een formele wet geregeld dienen te zijn. Bovendien dient in de toelichting duidelijk te zijn of het

om een uitputtende en daardoor uitsluitende dan wel om een ten opzichte van de Wob aanvullende voorziening gaat. Beide zijn niet het geval.

Uit de tekst van de Memorie van toelichting van de Wet op de dierproeven (p.16 en 17) volgt dat de inhoud van een verleende vergunning openbaar wordt gemaakt in de vorm van een niet-technische samenvatting. De niet-technische samenvatting geeft daarmee geen samenvatting van de volledig opgevraagde stukken. Gelet op de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 23 september 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:2997) is hier in dit geval onvoldoende reden voor.

Bedrijfs- en fabricagegegevens

Artikel 10 lid 1 aanhef en onder c van de Wob bepaalt dat het verstrekken van informatie achterwege blijft voor zover dit bedrijfs- en fabricagegegevens betreft, die door natuurlijke personen of rechtspersonen vertrouwelijk aan de overheid zijn medegedeeld.

Inzichtelijk dient te zijn dat de in de stukken neergelegde informatie, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Het betreffende artikel dient naar zijn aard restrictief te worden uitgelegd. De ingediende zienswijzen van derde belanghebbenden spelen een belangrijke rol in de afweging van de betrokken belangen van de verzoeker van de documenten versus derde belanghebbenden.

Het slechts verwijzen naar het gegeven dat de informatie vertrouwelijk aan de overheid zou zijn verstrekt of dat sprake is van het in gevaar komen van de concurrentiepositie is onvoldoende voor een beroep op voornoemde weigeringsgrond. Dat openbaarmaking van de krachtens deze weigeringsgrond geweigerde informatie een inzicht zou geven in de bedrijfsvoering van het bedrijf is onvoldoende voor het oordeel dat het om vertrouwelijke bedrijfs- en fabricagegegevens gaat. Voor het bovenstaande wordt verwezen naar de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State (hierna: Raad van State) van 23 december 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:3976) en de uitspraken van 20 november 2013 (ECLI:NL:RVS:2013:2004) en 17 juli 2013 (ECLI:NL:RVS:2013:288).

De vergunninghouder en de DEC bij NTS2015123 en NTS2015152 hebben middels een zienswijze aangegeven dat de stukken bedrijfs- en fabricagegegevens kunnen bevatten en dat de stukken vertrouwelijk informatie kunnen bevatten, waarvoor met een derde partij contractuele afspraken zijn gemaakt.

Deze vergunninghouder en DEC hebben voorts aangegeven dat informatie over onderzoeksmethoden en -technieken, productiemethoden en producten zeer vertrouwelijk is en bedrijfs- en fabricagegegevens betreft. Indien dergelijke informatie wel openbaar wordt gemaakt, dan kan dat ook het voornemen om patent te vestigen en promotieonderzoek uit te voeren bemoeilijken en zelfs geheel belemmeren. Hoewel in de algemene zienswijze is verwoord dat dergelijke gegevens geweigerd dienen te worden, ontbreekt in de specifieke zienswijze



behorend bij de twee vergunningen een nadere onderbouwing waarom de betreffende weigeringsgrond op deze twee vergunningen van toepassing is.

De vergunninghouder bij NTS2015138 en NTS2015143 heeft middels een zienswijze aangegeven dat er (meer subsidiair) sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens nu uit de documenten kan worden afgeleid op welke terreinen de vergunninghouder actief is, om welk type onderzoek het gaat en de stand van zaken van haar activiteiten. De aantallen en soorten dieren die bij de dierproeven worden gebruikt, geven inzicht in de technische bedrijfsvoering en het werkproces binnen de vergunninghouder en de stand van het onderzoek.

Het is echter niet duidelijk hoe en wat voor inzicht het type onderzoek, de stand van research & development-activiteiten, de aantallen en soorten dieren geven in de technische bedrijfsvoering en het werkproces. Bovendien dient in de NTS te worden aangegeven welke diersoorten en welke aantallen dieren er worden gebruikt, waardoor deze informatie reeds openbaar is (dit volgt uit artikel 4, lid 2, onder a van de Dierproevenregeling).

Voor wat betreft NTS2015156 heeft de vergunninghouder aangegeven dat wanneer zij fundamenteel onderzoek doen, dit meestal is als development van een nieuwe techniek. Wanneer het gaat om toegepast of wettelijk vereist onderzoek, dan zijn het meestal commerciële projecten. Deze informatie is concurrentiegevoelig, omdat het trends en ontwikkelingen aangeeft die in de sector commercieel aantrekkelijk zijn. Het kan in een dergelijk geval voor de concurrent zinvol zijn om een dergelijk traject ook in te gaan of juist niet, omdat ze achterlopen in de ontwikkeling. Deze informatie staat echter al vermeld in de NTS behorend bij de projectvergunning, waardoor deze informatie reeds openbaar is.

Daarnaast verzoekt de vergunninghouder onder andere om de start- en einddatum van het project niet openbaar te maken, omdat het voor concurrenten aangeeft wanneer de vergunninghouder van plan is bepaalde diensten aan haar klanten aan te bieden.

Voorts heeft de vergunninghouder bij deze vergunning aangegeven dat sommige documenten specifieke informatie bevatten over bijvoorbeeld toekomstige ontwikkelingen, productie-/fabricagetechnieken van de experimenteel toegepaste systemen, het type onderzoek dat wordt uitgevoerd en beoogde dieraantallen. De bewoordingen in deze zienswijze zijn dermate vrijblijvend dat het voor de CCD niet te beoordelen is of de beschreven situaties zich ook in deze vergunning voordoen.

De vergunninghouder bij NTS2015159 verzoekt om niet-openbaarmaking van de documenten projectvoorstel en de bijlagen beschrijving dierproeven, vanwege het feit dat deze documenten bedrijfs- en fabricagegegevens bevatten. De vergunninghouder heeft aangegeven dat bepaald type onderzoek wordt verricht en dat het type onderzoek en de type productiemethoden worden genoemd. Daarnaast worden diersoorten genoemd die voor dieractivisten reden kunnen zijn acties tegen het bedrijf uit te voeren.

Aangaande NTS2015169 heeft de vergunninghouder in de zienswijze aangegeven dat uit de documenten projectvoorstel en de bijlagen beschrijving dierproeven wetenswaardigheden kunnen worden afgeleid met betrekking tot de technische bedrijfsvoering en het productieproces, de onderzoeksstrategie, methoden en commerciële toepassing van de resultaten van het onderzoek. In de zienswijze is echter niet inzichtelijk gemaakt welke informatie het betreft en op welke manier dit uit deze documenten kan worden afgeleid. Uit de door de vergunninghouder gelakte documenten blijkt bovendien dat onder andere de diersoort geweigerd dient te worden, maar deze informatie is reeds in de NTS openbaar gemaakt.

Het slechts noemen van het gegeven dat er sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens is onvoldoende voor een beroep op deze weigeringsgrond. Dit geldt eveneens voor het aangeven dat er sprake is van een lopend onderzoek en dat het openbaar maken van deze gegevens leidt tot schade. Het slechts noemen zegt namelijk niets over de mate van gevoeligheid en de gevolgen van openbaarmaking. Om die reden zullen de betreffende gegevens voor wat betreft deze vergunningen niet worden geweigerd op grond van bedrijfs- en fabricagegegevens (zie hiervoor de motivering bij de uitspraak van de Raad van State van 23 december 2015 ECLI:NL:RVS:2015:3976).

Op grond van bovenstaande motivering worden de passages die bedrijfs- en fabricagegegevens bevatten niet geopenbaard. In de inventarislijst behorend bij voornoemde vergunning wordt aangegeven welke documenten het betreft.

Eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer

Op grond van artikel 10 lid 2 aanhef en onder e van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd.

In het merendeel van de documenten staan persoonsgegevens en afgeleide gegevens van persoonsgegevens vermeld. Hieronder wordt onder andere verstaan: persoonsnamen, telefoonnummers, bankrekeningnummers en emailadressen. De CCD is van oordeel dat ten aanzien van deze gegevens het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd zwaarder moet wegen dan het belang van openbaarheid. Uit de Memorie van Toelichting bij de Wod volgt dat de belangen van de bescherming van de gegevens die herleidbaar zijn naar personen in afweging tot openbaar maken van deze gegevens zwaar moet wegen.

Voor personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven en voor de medewerkers van het secretariaat van de CCD geldt dat zij geen publieke functie bekleden. Zij presenteren zich uit hoofde van hun functie niet in de openbaarheid (zie onder meer een uitspraak van de Raad van State van 3 februari 2010, ECLI:NL:RVS:2010:BL1844). Voorts is vaste rechtspraak dat de volgende gegevens in beginsel niet openbaar gemaakt hoeven worden: namen, telefoonnummers (werk en privé), e-mailadressen en handtekeningen en parafen die naar een persoon herleidbare persoonsgegevens zijn. Hierbij kan verwezen worden naar de uitspraken van de Raad van State van 18 juli 2007 (ECLI:NL:RVS:2007:BA9807), van 19 december 2012 (ECLI:NL:RVS:2012:BY6746) en van 12 juni 2013 (ECLI:NL:RVS:2013:CA2883). Van openbaarmaking van deze informatie wordt in beginsel afgezien indien het ambtenaren en derden betreft die niet uit hoofde van hun functie in de



openbaarheid treden. Op leden van het bestuur van de CCD zijn deze uitspraken in beginsel niet van toepassing.

Daarbij speelt een rol dat personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven een maatschappelijke taak uitoefenen en het risico lopen slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme². Uit de samenvattingen van het 39^{ste} en 40^{ste} Dreigingsbeeld Terrorisme Nederland (DTN39 en DTN40) van respectievelijk juni en november 2015 blijkt dat er nog altijd extremistische actievoerders voor dierenrechten actief zijn. De nadruk ligt primair op activistische actievormen, met als uitzondering het heimelijk maken van filmopnames en het plegen van vernielingen. Uit de samenvatting van het 41^{ste} DTN van maart 2016 blijkt dat er rond het dierenrechtenextremisme al jaren weinig activiteit wordt gesignaleerd. Weinig activiteit betekent echter niet dat er helemaal geen activiteit is, waardoor hier niet aan voorbij mag worden gegaan. Mede om die reden zijn de persoonsgegevens in deze documenten geanonimiseerd.

De vergunninghouder bij NTS2015138 en NTS2015143 heeft middels een zienswijze aangegeven dat (meer subsidiair) bekendmaking van persoonsgegevens en andere informatie die rechtstreeks of op vrij eenvoudige wijze te herleiden is naar de vergunninghouder, de anonimiteit van de vergunninghouder en haar medewerkers in gevaar brengen. Dit terwijl de Dierproevenrichtlijn en de WOD nadrukkelijk bepalen dat de anonimiteit van de gebruikers en hun personeel nooit in het gedrang mag worden gebracht.

De contact- en adresgegevens van de DEC behorend bij NTS2015138, NTS2015143, NTS2015159 en NTS2015169 worden niet openbaar gemaakt. In de zienswijze is aangegeven dat deze gegevens verwijzen naar een privéadres van een aan de DEC verbonden persoon. Daarmee zijn deze gegevens direct herleidbaar tot een natuurlijk persoon. Daar komt bij dat personen van deze DEC in het verleden geconfronteerd zijn met acties van dieractivisten en de vrees blijft bestaan dat opnieuw dergelijke gerichte acties plaatsvinden. Voornoemde gegevens blijven op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer en het voorkomen van onevenredige benadeling geweigerd.

Door derde belanghebbenden, waaronder door de vergunninghouder bij NTS2015157, is in hun zienswijzen in vergelijkbare bewoordingen aangegeven dat sprake is van het bovenstaande. Een derde belanghebbende gaf daarbij aan dat tevens kan worden verwezen naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543), waarin de rechter heeft bepaald dat ook de locatiegegevens en de aanduiding van organisatorische werkeenheden onder het belang van de bescherming van de persoonlijke levenssfeer vallen; naar de uitspraak van de Raad van State van 16 februari 2010 (ECLI:NL:RVS:2011:BP4706), naar de uitspraak van de rechtbank Oost-Brabant van 22 december 2014 (ECLI:NL:RBOBR:2014:7815) en ten overvloede naar de uitspraak van de rechtbank Den Haag van 20 september 2005 (ECLI:NL:RBSGR:2005:AU4809).

¹ Blz. 14 Memorie van Toelichting Wet op de Dierproeven

Op grond van het bovenstaande komt de CCD tot de conclusie dat ten aanzien van persoonsgegevens en afgeleide gegevens van persoonsgegevens het belang van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaarder dient te wegen dan het belang van openbaarheid. Deze gegevens zullen in de betrokken documenten worden geweigerd. In de inventarislijsten is per projectvergunning aangegeven welk documenten gedeeltelijk worden geopenbaard op grond van bovenstaande wettelijke weigeringsgrond.

Uit de uitspraak van de Raad van State van 12 juni 2013 (ECLI:NL:RVS:CA2883) volgt voorts dat ambtenaren die besluiten krachtens mandaat hebben ondertekend in beginsel moeten aanvaarden dat hun namen met de ondertekening van de besluiten naar buiten komen (zie tevens de uitspraak van de Raad van State van 6 augustus 2014, ECLI:NL:RVS:3002).

Namen van vergunninghouders waarin een eigenaam is verwerkt, worden – indien hiervan sprake is – bij dit besluit geopenbaard (zie voor overige vergunninghouders hieronder de alinea's 'het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling'). Blijkens de uitspraak van de rechtbank Amsterdam van 26 juni 2012 (ECLI:NL:RBAMS:2012:BX5021) kan worden gesteld dat de natuurlijke personen er zelf voor hebben gekozen om onder hun eigenaam deel te nemen aan het handelsverkeer door hun onderneming hun eigenaam te geven. Naar het oordeel van de rechtbank kan bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens geen sprake zijn van een zodanige schending van het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer van deze natuurlijke personen. De openbaarmaking betreft immers niet de natuurlijke persoon, maar de naam van de door die persoon gedreven onderneming.

Het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling

Conform artikel 10 lid 2 aanhef en onder g van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling van bij de aangelegenheid betrokken natuurlijke personen of rechtspersonen dan wel van derden.

Herleidbaarheid

Integrale openbaarmaking van de door u opgevraagde gegevens leidt in bepaalde gevallen tot onevenredige benadeling van de organisaties en de medewerkers waarop de gegevens betrekking hebben. In de bijgevoegde inventarislijsten is per document aangegeven welke documenten informatie bevatten die rechtstreeks of op zeer eenvoudige wijze te herleiden is naar de betrokken personen. Het is niet uitgesloten dat openbaarmaking van deze gegevens vanuit dierenrechtenactivisme buitensporige reactie kan opleveren jegens deze personen. Uit de samenvattingen van het 39^{ste} en 40^{ste} Dreigingsbeeld Terrorisme Nederland (DTN39 en DTN40) van respectievelijk juni en november 2015 blijkt dat er nog altijd extremistische actievoerders voor dierenrechten actief zijn. De nadruk ligt primair op activistische actievormen, met als uitzondering het heimelijk maken van filmopnames en het plegen van vernielingen. Uit de samenvatting van het 41^{ste} DTN van maart 2016 blijkt dat er rond het dierenrechtenextremisme al jaren weinig activiteit wordt gesignaleerd. Weinig activiteit betekent echter niet dat er helemaal geen activiteit is, waardoor hier niet aan voorbij mag worden gegaan.



Om die reden zullen de navolgende gegevens – waarmee deze organisaties of personen geïdentificeerd kunnen worden – uit de documenten worden verwijderd:

- Namen van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen (zie hiervoor tevens het kopje 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer');
- Locatiegegevens van (sub)locaties, zoals straatnaam, postcode, plaats, maar ook de afdeling en het organisatieonderdeel wanneer deze door de betreffende organisatie nog niet zijn geopenbaard, door bijvoorbeeld een vermelding op een website;
- Emailadressen, telefoonnummers, faxadressen en rekeningnummers die direct herleidbaar zijn tot personen (zie hiervoor tevens het kopje 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer');

De hoofdlocaties van de verschillende instellingen worden (over het algemeen) wel geopenbaard middels dit besluit, nu deze locaties over het algemeen reeds openbaar zijn.

Daarnaast worden ook de namen van de vergunninghouder, de adviserende DEC en het deelnemernummer van de vergunninghouder geopenbaard. Hierop zijn echter – voor wat betreft de naam van de vergunninghouder – twee (drie, gezien het aantal vergunningen) uitzondering gemaakt (NTS2015138, NTS2015143 en NTS2015159), welke hieronder zal worden toegelicht. In de zienswijzen is slechts aangegeven dat het een feit van algemene bekendheid is dat er risico bestaat op buitensporige reacties jegens de vergunninghouders en/of DEC's, waardoor deze gegevens niet mogen worden geopenbaard. Dit wordt echter niet concreet onderbouwd, door bijvoorbeeld het overleggen van een lijst waaruit de ernst en de frequentie van acties tegen vergunninghouders blijkt. De CCD is van oordeel dat derde belanghebbenden – mocht dit zijn aangegeven middels de zienswijze – over het algemeen niet aannemelijk hebben gemaakt dat, of op welke wijze, de openbaarmaking van het deelnemernummer tot identificatie van bij dierproeven betrokken personen kan leiden (zie de uitspraken van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014, ECLI:NL:RBGEL:2014:4555 en 23 juli 2015 ECLI:NL:RBGEL:2015:7608).

De vergunninghouder bij NTS2015138 en NTS2015143 heeft aangegeven dat het een feit van algemene bekendheid is dat (rechts)personen die zich bezighouden met dierproeven het risico lopen om het doelwit te worden van dierenrechtenactivisten. Uit diverse rapportages over dierenrechtenactivisme in Nederland, zoals de rapportages en jaarverslagen van de AIVD, het Ministerie van Binnenlandse Zaken en Koninkrijksrelaties en het Ministerie van Economische Zaken blijkt dat dierenrechtenactivisten zich bedienen van intimidatie, bedreiging, brandstichting, vernielingen en geweld jegens partijen die dierproeven uitvoeren. Juist vanwege het risico op dergelijk extremisme dient zeer terughoudend te worden omgegaan met de openbaarmaking van informatie over dierproeven. Zoals hiervoor reeds is gesteld, is het niet voldoende om slechts aan te geven dat het een feit van algemene bekendheid is dat (rechts)personen die zich bezighouden met dierproeven het risico lopen om het doelwit te worden van dierenrechtenactivisten. Voor wat betreft de genoemde rapportages kan echter aansluiting worden gezocht bij de documenten die worden genoemd in de uitspraak van de rechtbank Den Haag van 26 februari 2016 (SGR 14/10530). De

vergunninghouder heeft hierbij aangegeven dat de dreiging onverminderd actueel is en dat er op het terrein van de vergunninghouder acties van dierenrechtenactivisten hebben plaatsgevonden.

Met betrekking tot NTS2015159 heeft de vergunninghouder aangegeven dat de naam en de contactgegevens van de vergunninghouder geweigerd dienen te worden. Medewerkers en opdrachtgevers van de vergunninghouder moeten vrij van druk kunnen functioneren en het is daarom van belang dat zij niet worden blootgesteld aan mogelijke acties van dieractivisten. In het recente verleden zijn bedreigingen geuit aan de vergunninghouder en is het bedrijf geconfronteerd met acties tegen het bedrijf. Tijdens de hoorzitting in een andere procedure heeft de vergunninghouder verduidelijkt dat het ging om meerdere persoonlijke bedreigingen en verwensingen, ook gericht aan de familieleden van de betrokkene. Deze bedreigingen hebben binnen een tijdsbestek van vier jaar plaatsgevonden.

Om die reden zullen de naam van de bovenstaande vergunninghouders en de locatiegegevens van de bovenstaande vergunninghouders niet worden openbaar. Het aanvraagnummer en het deelnemernummer zullen wel openbaar worden gemaakt.

De vergunninghouder en de DEC behorend bij NTS2015135 en NTS2015213 hebben middels een zienswijze aangegeven dat persoonsgegevens zoals namen van medewerkers, organisatie-specifieke, interne adresgegevens (dus niet de naam van de instelling of de DEC), telefoonnummers, huispostnummers, kamernummers en bankrekeningnummers die herleidbaar zijn tot individuele personen geanonimiseerd dienen te worden. Deze gegevens zijn eenvoudig te herleiden tot individuele medewerkers die op een of andere manier betrokken zijn bij het onderzoek. In de ene vergunning dienen ook bepaalde functienamen geanonimiseerd te worden, nu deze gegevens te vereenzelvigen zijn met één persoon. Via openbare bronnen, zoals (maar niet beperkt tot) registers, jaarboeken en andere bronnen is de loopbaan van bepaalde betrokken personen te volgen. Hierdoor zijn de functienamen te herleiden tot natuurlijke personen. Het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer weegt in deze gevallen zwaarder dan het belang van openbaarheid. Uit de Memorie van Toelichting bij de Wod volgt dat de belangen van de bescherming van de gegevens die herleidbaar zijn naar personen in afweging tot openbaar maken van deze gegevens zwaar moet wegen.

De contact- en adresgegevens van de DEC behorend bij NTS2015138, NTS2015143, NTS2015159 en NTS2015169 worden niet openbaar gemaakt. In de zienswijze is aangegeven dat deze gegevens verwijzen naar een privéadres van een aan de DEC verbonden persoon. Daarmee zijn deze gegevens direct herleidbaar tot een natuurlijk persoon. Daar komt bij dat personen van deze DEC in het verleden geconfronteerd zijn met acties van dieractivisten en de vrees blijft bestaan dat opnieuw dergelijke gerichte acties plaatsvinden. Voornoemde gegevens blijven op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer en het voorkomen van onevenredige benadeling geweigerd.

De vergunninghouder en de DEC behorend bij NTS2015123 en NTS2015152 hebben middels een algemene zienswijze aangegeven dat het verleden heeft



aangetoond dat het extremisme zeer serieuze en bedreigende vormen kan aannemen. De impact van dergelijke acties was en is bij de instelling nog steeds groot. Daaruit blijkt dat alleen al het prijsgeven van de naam en (adres)gegevens van de projectvergunninghouder een inbreuk op de persoonlijke levenssfeer oplevert. In de specifieke zienswijze behorend bij deze twee vergunningen ontbreekt echter een nadere concretisering waarom het voornoemde betrekking heeft op deze twee specifieke gevallen.

Aangaande NTS2015169 heeft de vergunninghouder aangegeven dat integrale openbaarmaking van de gegevens leidt tot onevenredige benadeling van het bedrijf en de medewerkers waarop de gegevens betrekking hebben. Het is niet uitgesloten dat openbaarmaking een buitensporige reactie vanuit dierenrechtenactivisme kan opleveren. Alle informatie waardoor het bedrijf of de medewerkers geïdentificeerd kunnen worden, dient te worden verwijderd. De bewoordingen in dit gedeelte van deze zienswijze zijn dermate vrijblijvend dat er geen sprake is van concrete voorbeelden van acties die binnen een recent tijdsbestek hebben plaatsgevonden.

Voorkomen van fraude

Wanneer de CCD handtekeningen van bestuurders openbaar maakt, zijn deze eenvoudig te kopiëren. Het is niet uitgesloten dat kwaadwillende personen deze handtekeningen gebruiken voor frauduleuze doeleinden. Het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling weegt de CCD hier zwaarder dan het belang van openbaarmaking. Derhalve zijn in alle besluiten en overige brieven de handtekeningen geanonimiseerd.

Concurrentiegevoelige informatie

Indien openbaarmaking van concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie leidt tot onevenredige benadeling, kan onder omstandigheden succesvol een beroep op de weigeringsgrond onevenredige benadeling worden gedaan. In een gedeelte van de ingediende zienswijzen is voldoende onderbouwd dat openbaarmaking van bepaalde gegevens afbreuk doet aan de concurrentiepositie en schade kan veroorzaken aan proefopstellingen/proefomstandigheden. Voor wat betreft de overige – hieronder niet genoemde – zienswijzen is het hiervoor genoemde onvoldoende onderbouwd. Welke informatie concurrentiegevoelig is en de wijze waarop dit hun concurrentiepositie negatief beïnvloedt, is onvoldoende onderbouwd. Bovendien is de vrees dat in de toekomst de vergunninghouder of de DEC nadeel of schade kan ondervinden onvoldoende om de informatie te weigeren.

Het bestuur respecteert overigens het gestelde belang van bescherming van onderzoek en de hieruit voortvloeiende mogelijkheid van de eerste publicatie van de onderzoeker op het betreffende gebied en de eventueel te vestigen patenten.

Voor wat betreft de bijlagen bij een vergunningaanvraag, dat wil zeggen het projectvoorstel, de bijlage(n) beschrijving dierproeven en eventuele aanverwante documenten, speelt de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543) een belangrijke rol. In de uitspraak werd geweigerd om de vraagstelling te openbaren die leidde tot het ontwerp van de proeven. De rechtbank stelde dat het voor de onderzoekers van belang is dat hun onderzoeksideeën niet openbaar worden gemaakt, zodat zij als eerste met (de

resultaten van) hun onderzoek naar buiten kunnen treden. In dit kader is van belang dat er een voornemen bestaat tot publicatie of dat patent wordt aangevraagd.

De vergunninghouder bij NTS2015138 en NTS2015143 heeft aangegeven dat wanneer de informatie uit de documenten niet kan worden beschouwd als bedrijfs- en fabricagegegevens, er sprake is van andere bedrijfsvertrouwelijke of anderszins concurrentiegevoelige informatie, waarvan de openbaarmaking de vergunninghouder onevenredig zou benadelen dan wel concurrenten of derden onevenredig zou bevoordelen. De concurrentiegevoelige informatie is zodanig vervlochten met de resterende gegevens dat er geen splitsing kan worden gemaakt tussen vertrouwelijke informatie en overige informatie. Hieruit blijkt echter onvoldoende dat de informatie op grond van het belang van onevenredige benadeling dan wel bevoordeling geweigerd dient te worden.

De vergunninghouder bij NTS2015159 heeft in haar zienswijze aangegeven dat de documenten projectaanvraag, projectvoorstel en de bijlagen beschrijving dierproeven niet geopenbaard mogen worden, omdat hieruit blijkt dat contract research wordt verricht. Daarnaast staat in deze documenten vermeld welke type onderzoek wordt verricht en welke productiemethoden worden gebruikt. Dit is concurrentiegevoelige informatie. Verder worden diersoorten genoemd die voor dieractivisten reden kunnen zijn acties tegen de instelling uit te voeren. Deze motivering is echter ontoereikend om de gegevens op basis van deze weigeringsgrond te weigeren. Bovendien zijn de diersoorten en het aantal dieren reeds middels de NTS openbaar gemaakt.

Aangaande NTS2015169 heeft de vergunninghouder in de zienswijze aangegeven dat de documenten projectvoorstel en de bijlagen beschrijving dierproeven concurrentiegevoelige informatie bevatten. Openbaarmaking zou concurrenten onevenredig bevoordelen, zij krijgen op eenvoudige wijze en zonder investeringen inzicht in bedrijfsvertrouwelijk en concurrentiegevoelige informatie.

Deze motiveringen zijn ontoereikend om documenten dan wel gegevens te weigeren op grond van het voorkomen van onevenredige benadeling. Dat openbaarmaking van deze informatie een inkijk zou geven in de bedrijfsvoering van het bedrijf is onvoldoende voor het oordeel dat er onevenredige benadeling optreedt. Hierbij kan aangesloten worden bij de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 23 december 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:3976). Niet aannemelijk is voorts dat alle informatie – voor zover dit middels de zienswijzen is aangegeven – in de genoemde documenten vertrouwelijk is en niet geopenbaard kan worden. Het is voor de CCD echter niet mogelijk om zelf een selectie te maken in de gegevens die wel en niet geopenbaard kunnen worden. Deze zienswijzen kunnen derhalve niet worden gevolgd.

De vergunninghouder bij NTS2015157 geeft middels een zienswijze en per document aan dat uit bepaalde passages – die in de meegestuurde documenten bij de zienswijze nader zijn gespecificeerd – de onderzoeksstrategie van de onderzoeker voor de komende jaren blijkt. Een gedeelte van de informatie dient niet geopenbaard te worden, omdat onevenredige bevoordeling of benadeling voorkomen dient te worden. De onderzoeksstrategie behelst het meest essentiële



deel van de bedrijfsvoering en het productieproces van een onderzoek. Met de wetenschap van de onderzoeksstrategie kan een derde hetzelfde onderzoek verrichten. Als bepaalde onderzoeksstrategieën op deze wijze al openbaar worden gemaakt, kunnen deze niet meer beschermd worden door intellectuele eigendomsrechten (patenten). Daarnaast betreft genoemde informatie gegevens die de basis kunnen vormen voor octrooiaanvraag. Voor onderzoekers heeft dit tot gevolg dat zij financiële schade oplopen. Daarnaast lopen zij imagoschade op, nu het in het betreffende vakgebied draait om het als eerst naar buiten treden met vernieuwende onderzoeksresultaten. De vergunninghouder verwijst hierbij naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543). Daarnaast kan verwezen worden naar de uitspraak van de Raad van State van 28 juli 2010 (ECLI:NL:RVS:2010:BN2615). Alleen die woorden of tekstdelen die inzicht geven in deze onderzoeksstrategieën zijn geweigerd. Het merendeel van de informatie in de documenten behorend bij deze vergunning is openbaar gemaakt.

Hierbij kan worden aangevuld dat de CCD niet als taak heeft om te controleren of een vergelijkbare vergunningaanvraag al eerder is ingediend en dat de CCD niet controleert of een bepaald onderzoek wordt gekopieerd.

Op grond van bovenstaande motivering worden de passages die kunnen leiden tot onevenredige benadeling niet geopenbaard. In de inventarislijsten behorend bij de betrokken vergunning wordt aangegeven welke documenten het betreft.

Persoonlijke beleidsopvattingen in een stuk bestemd voor intern beraad

Artikel 11 lid 1 van de Wob bepaalt dat in geval van een verzoek om informatie uit documenten, opgesteld ten behoeve van intern beraad, geen informatie wordt vertrekt over daarin opgenomen persoonlijke beleidsopvattingen.

Alle ambtelijke adviezen zijn opgesteld ten behoeve van intern beraad en bevatten persoonlijke beleidsopvattingen. De CCD acht het niet van belang voor een goede en democratische bestuursvoering indien standpunten 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 persoonlijke beleidsopvattingen. De ambtelijke adviezen bevatten ook feitelijke informatie. Deze feitelijke informatie is echter zodanig verweven met de persoonlijke beleidsopvattingen, dat die daar niet los van kan worden gezien (zie onder andere de uitspraak van de Raad van State van 24 juni 2015, ECLI:NL:RVS:2015:1942). In de ambtelijke adviezen worden ook data van de vergaderingen genoemd. Deze data worden niet geopenbaard, vanwege de verwachting dat kort voor de betreffende vergaderingen een piek zal optreden in het aantal vergunningaanvragen. Het niet kenbaar maken van de data van de vergaderingen zorgt voor een natuurlijke spreiding van de vergunningaanvragen. De CCD heeft om deze redenen beslist om alle ambtelijke adviezen geheel te weigeren.

De vergunninghouder bij NTS2015138 en NTS2015143 heeft in de zienswijze aangegeven dat de DEC-adviezen eveneens onder artikel 11 van de Wob geweigerd dienen te worden nu de adviezen in het kader van de Wob opgesteld dienen te worden en de adviezen eigen opvattingen, aanbevelingen en conclusies bevatten. De DEC-adviezen zijn afkomstig van en opgesteld door de betrokken

DEC. Ook deze DEC heeft een zienswijze ingediend en daaruit blijkt dat de DEC kan instemmen met gedeeltelijke openbaarmaking van deze stukken, onder doorhaling van de door de DEC onleesbaar gemaakte informatie. Voor wat betreft de DEC-adviezen heeft de DEC aangegeven dat de contactgegevens van de DEC en (gedeeltelijk) het aanvraagnummer dienen te worden. De CCD zal de DEC-adviezen, met uitzondering van de gegevens die direct herleidbaar zijn tot personen, openbaar maken.

In de inventarislijsten behorende bij de projectvergunningen is aangegeven welke documenten geheel of gedeeltelijke worden geweigerd op grond van bovenstaande wettelijke weigeringsgrond.

Wijze van openbaarmaking

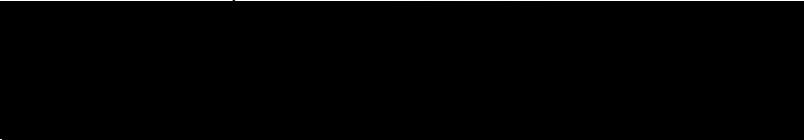
De verwachting bestaat dat (derden)belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie. Derhalve vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten – conform artikel 6 lid 5 van de Wob – niet eerder plaats dan vier weken na dagtekening van dit besluit. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking van de documenten tegen te houden. Dit kan door het indienen van een bezwaarschrift bij de CCD 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 bezwaarschrift is ingediend en een verzoek om voorlopige voorziening is gedaan, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

De documenten die met dit besluit voor eenieder openbaar worden, zullen na afloop van bovengenoemde termijn op de website van de CCD (www.centralecommissiedierproeven.nl) worden geplaatst.

Hopende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,
namens deze,



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

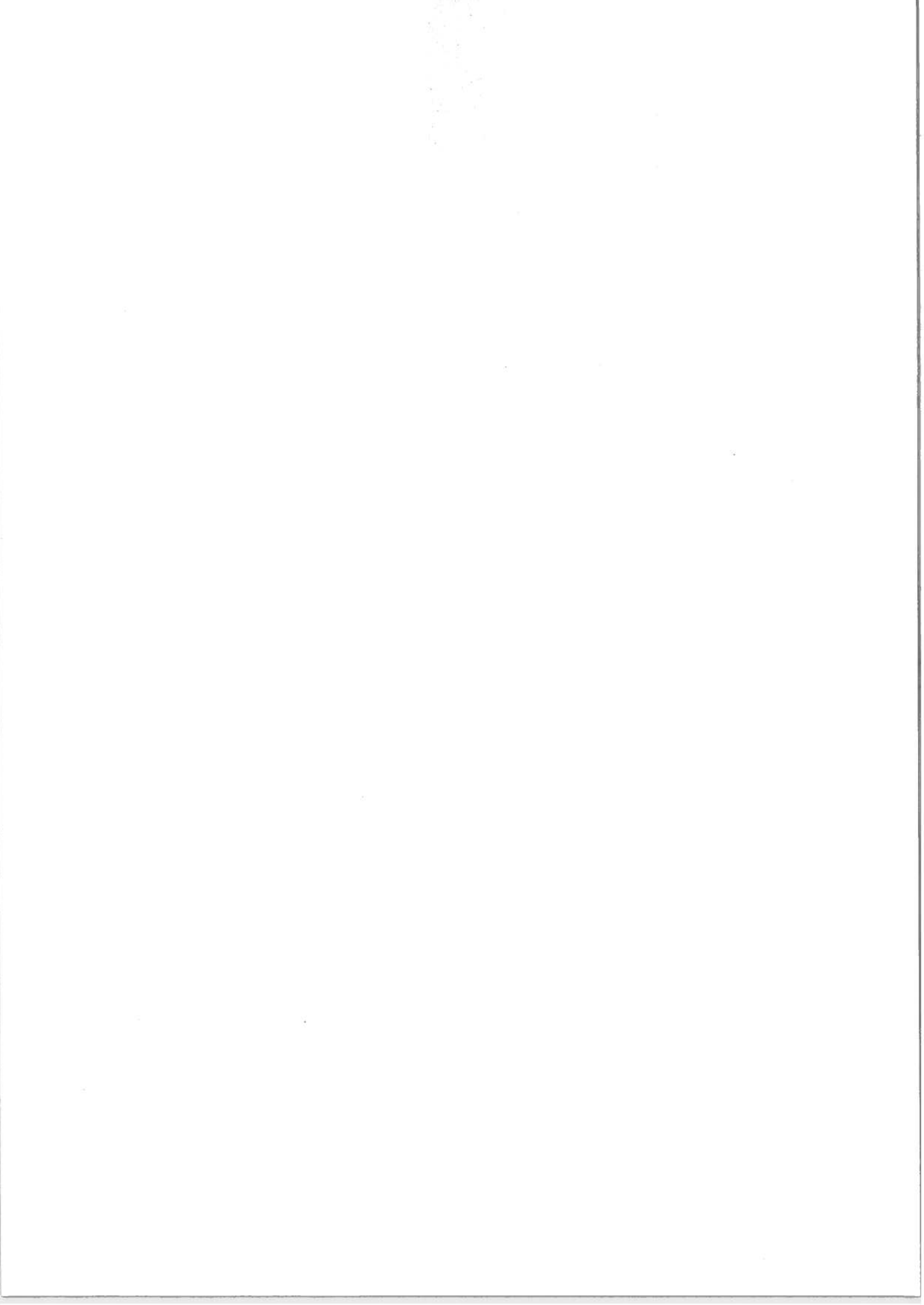


Bezwaar

Indien u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Het bezwaarschrift kunt u sturen naar de Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag. Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen wij u in ieder geval – buiten de in de wet geregelde voorschriften – de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het onderwerp te vermelden. U vindt deze gegevens bovenaan deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat het bestreden besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank. 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 www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx kunt u zien onder welke rechtbank uw vestigingsplaats valt.



Inventaris Wob-verzoek W15-12									
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015123								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Mail ontvangstbevestiging 25-8-2015				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling				x		x	x	
10	Factuur				x		x	x	
11	Mail stand van zaken 3-9-2015				x		x	x	
12	Mail acceptatiebrief 4-9-2015				x		x	x	
13	Acceptatiebrief				x		x	x	
14	Mail vragen I 7-9-2015				x		x	x	
15	Mail vragen II 8-9-2015				x		x	x	
16	Mail reacties I 15-9-2015				x		x	x	
17	Mail reacties II 17-9-2015				x		x	x	
18	Advies CCD		x						x
19	Mail besluit 21-9-2015				x		x	x	
20	Beschikking en vergunning				x		x	x	
21	Mail terugkoppeling DEC 8-10-2015				x		x	x	



01 SEP. 2015

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.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? Ja > Vul uw deelnemernummer in 40100 123
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

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

Naam instelling of organisatie	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]

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

KvK-nummer	9098104
Straat en huisnummer	[Redacted]
Postbus	[Redacted]
Postcode en plaats	[Redacted] Wageningen
IBAN	NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR

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]	

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

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


6 Ondertekening

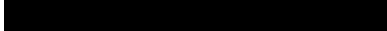
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

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 Wageningen

Datum 06 - 08 - 2015

Handtekening 





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.

Varkensbedrijven variëren aanzienlijk in technische resultaten, deels door verschillen in

genetische achtergrond, huisvesting, management en voersamenstelling, maar een aanzienlijk deel is ook te verklaren door verschil in gezondheidsstatus tussen bedrijven.

Gezondheidsstatus kan een grote invloed hebben op de voedingsbehoefte van varkens (Van der Peet en Jansman, 2007). Een belangrijke conclusie uit dit onderzoek was dat de nutriëntenbehoefte hoger werd bij varkens met een geactiveerd immuunsysteem.

Activatie van het immuunsysteem als gevolg van lage sanitaire condities kan invloed hebben op de aminozuurstofwisseling van varkens. Bij activatie van het immuunsysteem wordt de productie van ontstekings-eiwitten gestimuleerd en toename in productie van deze ontstekings-eiwitten kan grote invloed hebben op de aminozuurbehoefte van het varken.

Behoeften aan de aminozuren tryptofaan, methionine en threonine zijn hoger, door een gemeten hoger verbruik van deze aminozuren bij dieren met een geactiveerd immuunsysteem (Le Floch et al., 2009; Melchior et al., 2004; Rakhshadeh et al., 2013).

Naast de aminozuurbehoefte wordt de energiebehoefte ook beïnvloed door het stimuleren van het immuunsysteem (Benson et al., 1993; Humphrey and Klasing, 2004). Koorts en productie van ontstekings-eiwitten door de lever kosten energie (Lochmiller and Deerenberg., 2000; Parmentier et al., 2002). In verschillende studies met varkens waarin het immuunsysteem werd geactiveerd werd een lagere groei gevonden. Deze verlaging kon niet volledig uit een verlaging van de voeropname worden verklaard (Pastorelli et al., 2012) en kan dus worden gerelateerd aan een verhoogde behoefte aan energie van de dieren. Deze bevinding laat zien dat de energiestofwisseling wordt beïnvloed door het stimuleren van het immuunsysteem. De veranderde energie-efficiëntie kan het gevolg zijn van verhoogd energiegebruik voor en door het immuunsysteem. De verhoogde energiebehoefte bij immuunsysteemactivatie (verhoogde onderhoudsbehoefte voor energie) kan worden gemeten via vaststelling van de warmteproductie bij vasten in respiratieonderzoek. Stimulatie van het immuunsysteem kan ook de maximale spieraanzet verlagen of de prioriteit en verhouding van de aanzet van eiwit en vet in het lichaam veranderen, zoals onder meer bij pluimvee vastgesteld (Parmentier et al., 2002).

De resultaten van het voorziene onderzoek dragen bij aan een verbeterde afstemming tussen het aanbod van nutriënten via het voer en de nutritionele behoeften van varkens gehouden onder specifieke condities en rekening houdend met hun gezondheidsstatus. Implementatie van het onderzoek draagt tevens bij aan een efficiënter gebruik van nutriënten uit het voer door varkens en leidt tot een vermindering van de belasting van het milieu door een verlaging van de uitscheiding van niet benutte nutriënten via de mest en urine.

Referenties

- Benson, B. N., C. C. Calvert, E. Roura, and K. C. Klasing. 1993. Dietary energy source and density modulate the expression of immunologic stress in chicks. *The Journal of Nutrition* 123: 1714-1723.
- Humphrey, B. D., and K. C. Klasing. 2004. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. *World's Poultry Science Journal* 60: 90-100.
- Kampman-Van de Hoek, E. 2015. Impact of health status on amino acid requirements of growing pigs : towards feeding strategies for farms differing in health status.
- Le Floch, N., L. LeBellego, J. J. Matte, D. Melchior, and B. Seve. 2009. The effect of sanitary status degradation and dietary tryptophan content on growth rate and tryptophan metabolism in weaning pigs. *J. Anim Sci.* 87(5):1686-1694.
- Lochmiller, R. L., and C. Deerenberg. 2000. Trade-Offs in Evolutionary Immunology: Just What Is the Cost of Immunity? *Oikos* 88: 87-98.
- Melchior, D., B. Sève, and N. Le Floch. 2004. Chronic lung inflammation affects plasma amino acid concentrations in pigs. *Journal of Animal Science* 82(4):1091-1099.
- Parmentier, H. et al. 2002. Increased fat deposition after repeated immunization in growing chickens. *Poultry Science* 81: 1308-1316.
- Pastorelli, H., J. van Milgen, P Lavotto, and L. Montagne. 2012b. Meta-analysis of feed intake and growth responses of growing pigs after sanitary challenge. *Animal* 6: 952-961.

Rakhshandeh, A., J. K. Htoo, N. Karrow, S. P. Miller, and C. F. M. d. Lange. 2014. Impact of immune system stimulation on the ileal nutrient digestibility and utilization of methionine plus cysteine intake for whole-body protein deposition in growing pigs. *British Journal of Nutrition* 111:101-110.

Van der Peet en Jansman, 2007. Effect van gistcultuur op de technische resultaten, darmgezondheid en immuun functie bij gespeende biggen. ASG rapport 68.

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 kwantificeren van het effect van sanitaire condities en nutriëntsamenstelling van het voer op de energiestofwisseling van varkens.
- Het evalueren van het effect van aanpassingen in nutriëntsamenstelling van het voer op basis van de resultaten van het uitgevoerde respiratieonderzoek op de productieresultaten (voeropname, groei en voederconversie) van vleesvarkens op een praktijkbedrijf waarop een contrast in sanitaire condities wordt aangebracht.

Op basis van eerder uitgevoerd onderzoek is bekend dat de aminozuurbehoeften en groeiprestaties worden beïnvloed door de sanitaire condities waarin de dieren worden gehouden. Dit hangt onder meer samen met een grotere mate van activering van het immuunsysteem in dieren gehouden onder een lage sanitaire status, waarin zich meer subklinische aandoeningen voordoen.

Vanwege het voorgaande en omdat de eiwit- en energiestofwisseling van dieren sterk samenhangt worden beiden in onderhavig project in samenhang bestudeerd.

Door kwantitatieve kennis te ontwikkelen m.b.t. de effecten van sanitaire status van dieren op de energie- en aminozuurbehoefte en de toepassing ervan te valideren in een praktijkstudie, wordt verwacht dat het project voor de praktijk bruikbare adviezen zal opleveren. Deze adviezen kunnen worden gebruikt voor aanpassing van de samenstelling van voeders in afhankelijkheid van sanitaire status van vleesvarkensbedrijven. Deze kennis ontbreekt op dit moment.

Het belang van het onderzoek wordt onderstreept door de collectieve (financiële) ondersteuning van het onderzoek door vrijwel de gehele Nederlandse mengvoederindustrie.

De te gebruiken procedures om een contrast in sanitaire status aan te leggen met invloed op de mate van activatie van het immuunsysteem van vleesvarkens zijn eerder succesvol toegepast in een ander, reeds uitgevoerd onderzoeksproject.

3.3 Belang

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

Het hoofddoel is het in kaart brengen van de variatie in nutriëntbehoeften van klinisch gezonde varkens in afhankelijkheid van sanitaire status en mate van activering van het immuunsysteem. Kwantitatieve kennis omtrent de effecten van voorgaande op de behoefte aan energie van vleesvarkens ontbreekt thans.

Met deze kennis kan in de toekomst via de samenstelling van de voeding beter worden ingespeeld op de nutritionele behoeften van varkens onder verschillende

bedrijfsomstandigheden. Bij een goede afstemming van voeding op de behoefte van het varken kan de uitscheiding van nutriënten via mest en urine worden verlaagd en de benutting van energie en nutriënten uit grondstoffen worden geoptimaliseerd.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

In een eerste fase is literatuuronderzoek uitgevoerd om inzage te krijgen in de "state of the art" kennis omtrent de relatie tussen nutriëntbehoefte, sanitaire condities en mate van activatie van het immuunsysteem bij varkens. Op basis hiervan wordt vervolgens in vivo onderzoek opgezet en uitgevoerd om kwantitatieve gegevens omtrent de relaties te verkrijgen.

Vervolgens wordt validatieonderzoek uitgevoerd waarin verkregen resultaten worden vertaald naar aanpassingen in de samenstelling van het voer, welke vervolgens worden geëvalueerd in een evaluatie/validatiestudie op een vleesvarkensbedrijf.

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

Het project zal bestaan uit drie onderdelen,

1. een oriëntatie fase: hierin is het hiervoor genoemde literatuuronderzoek uitgevoerd en is door de betrokken kennisinstelling uitgevoerd relevant onderzoek in het kader van andere projecten nader geëvalueerd ter formulering van de doelstellingen van het onderhavige project en hierin uit te voeren onderzoek.
2. Uitvoering van onderzoek naar de effecten van sanitaire status op kwantitatieve veranderingen in het energiemetabolisme en de energiebehoefte van vleesvarkens in klimaat-/respiratie onderzoek.
3. Evaluatie van de effecten op basis van de resultaten van onderdeel 2. aangepaste voeders t.a.v. nutriëntensamenstelling op de productieresultaten van vleesvarkens in een groeistudie waarbij de dieren worden gehouden in verschillende sanitaire condities in een praktijk conforme setting.

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.

Het project zal bestaan uit 3 fases:

Fase 1. Oriëntatiefase: In deze fase is door middel van literatuurstudie en reeds uitgevoerd onderzoek, "state of the art" kennis op het betreffende onderzoeksterrein op een rij gezet en de doelstelling van het project geformuleerd (reeds uitgevoerd).

Uit de literatuurstudie volgde dat de voedingsbehoefte van vleesvarkens beïnvloed wordt door sanitaire condities. In een voorgaand experiment met 612 vleesvarkens op een praktijkbedrijf werd met name de eiwit- en aminozuurbehoefte bestudeerd van varkens bij lage en hoge sanitaire condities. Het contrast in sanitaire conditie dat was gebruikt in dit experiment wordt onderstaand kort beschreven aangezien deze aanpak succesvol bleek en ook in onderzoek in fasen 2 en 3 van onderhavige aanvraag zal worden toegepast. Deze zijn deels gebaseerd op Williams et al. (1997); Le Floc'h et al. (2009), Pastorelli et al. (2012).

- Het contrast in sanitaire conditie werd opgelegd per afdeling van de stal op het betreffende varkensbedrijf. Dieren werden gekocht bij één vermeerderaar met een lage sanitaire status.
- De lage sanitaire conditie afdelingen werden voor opleg van de dieren niet schoongemaakt en gedesinfecteerd. Daarnaast ondergingen deze varkens geen ontwormingskuur, geen antibioticumkuur bij opleg en geen vaccinaties tegen enkele bekende pathogenen/aandoeningen.
- De afdelingen met een hoge sanitaire conditie werd grondig schoongemaakt en gedesinfecteerd voor opleg van de dieren. De varkens van deze afdelingen kregen een

antibioticumkuur bij aanvoer, en een ontwormingskuur. Tevens kreeg deze groep varkens al voor aankomst bij de proefstal (dus nog op het bedrijf van oorsprong) een reeks aan vaccinaties tegen resp. mycoplasma, PIA, Circo, influenza, APP en PRRS.

Uit een eerder uitgevoerd experiment volgde dat varkens gehouden bij lage status baat hadden (verhoogde groei, lagere pleuritisscore in longen) bij verhoogde aminozuurniveaus in het voer. De aminozuren tryptofaan, methionine en threonine waren hierbij verhoogd. Uit hetzelfde onderzoek kwam naar voren dat een groot verschil in groei tussen lage en hoge sanitaire condities niet volledig uit verschillen in eiwit- en aminozuurbehoefte en de contrasten in eiwit- en aminozuuraanbod via het voer verklaard konden worden maar dat ook verschillen in energiebehoefte van de dieren bij een contrast in sanitaire status effect kunnen hebben gehad op de resultaten van de studie. Mede om deze reden wordt in onderzoek, waarop deze projectaanvraag betrekking heeft, nader onderzoek uitgevoerd naar de effecten van sanitaire status op de energiebehoefte van varkens.

Fase 2. Kwantificatiefase (dierproef volgnummer 1 bijlage 1): Deze fase richt zich op het kwantificeren van energiegebruik bij varkens met behulp van een experiment met vleesvarkens in klimaatrespiratiecellen. In deze respiratiecellen waarin groepen dieren worden gehuisvest worden alle in- en uitgaande luchtstromen gemeten en de samenstelling ervan bepaald (zuurstof en kooldioxide). Tevens wordt de verstrekte hoeveelheid voer en water, alsmede de kwantitatieve mest- en urineproductie bepaald en op samenstelling geanalyseerd. Op basis hiervan kan de kwantitatieve energiestofwisseling van de dieren in de cel worden bepaald alsmede de aanzet van eiwit en energie in het lichaam van de dieren en de nutriëntverteerbaarheid van het voer.

In het onderzoek in fase 2 zal gebruik worden gemaakt van dezelfde experimentele contrasten m.b.t. sanitaire status (laag en hoog) en aminozuursamenstelling van het voer (basaal en gesuppleerd) als toegepast in eerder uitgevoerd onderzoek, waarin de focus lag op het vaststellen van de effecten van sanitaire status op de aminozuurbehoefte van vleesvarkens. Door uitvoering van de studie in klimaatrespiratiecellen kunnen de effecten van de proefbehandelingen zowel op de groei, voederconversie, de lichaamsaanzet van eiwit en energie als de energiebehoefte en benutting van energie uit het voer worden gemeten.

Go/ no go beslissing; na fase 2 is er een go/no go moment waar zal worden besloten of het zin heeft om verder te gaan met fase 3. Deze beslissing zal worden genomen op basis van alle kennis die op dat moment vanuit het onderzoek binnen het project is opgedaan. Details omtrent te evalueren contrasten t.a.v. de samenstelling van de diëten of voedingsstrategieën in het experiment van fase 3 kunnen pas worden gegeven na het beschikbaar komen van de resultaten uit fase 2 van het project.

Fase 3. Validatiefase (dierproef volgnummer 2 bijlage 2): Deze fase richt zich op de validatie van de gevonden resultaten uit fase 1 en 2 in een groeistudie met vleesvarkens waarin voeders zullen worden geëvalueerd met een aangepaste nutriëntsamenstelling en/of nutriënt/energie verhouding. De studie zal worden uitgevoerd op een praktijkbedrijf met een praktijk conforme setting t.a.v. de huisvesting. Het aan te leggen contrast in sanitaire conditie zal vergelijkbaar zijn met die gebruikt in het experiment in fase 2 en in eerder uitgevoerd onderzoek door de betrokken kennisinstelling, waarnaar hiervoor is gerefereerd.

Referenties

- Le Floch, N., L. LeBellego, J. J. Matte, D. Melchior, and B. Seve. 2009. The effect of sanitary status degradation and dietary tryptophan content on growth rate and tryptophan metabolism in weaning pigs. *J. Anim Sci.* 87(5): 1686-1694.
- Pastorelli, H., Le Floch, N., Merlot, E., Meunier-Salaün, M.C., van Milgen J., Montagne L. 2012. Sanitary housing conditions modify the performance and behavioural response of

weaned pigs to feed- and housing-related stressors. *Animal* 6 (11):1811-1820.
Williams, N. H., T. S. Stahly, and D. R. Zimmerman. 1997. Effect of chronic immune system activation on the rate, efficiency, and composition of growth and lysine needs of pigs fed from 6 to 27 kg. *J. Anim Sci.* 75(9):2463-2471.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Experiment met vleesvarkens in klimaat respiratiecellen
2	Validatie experiment op een vleesvarken praktijkbedrijf
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.	40100	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Experiment met vleesvarkens in klimaatrespiratiecellen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit experiment heeft een 2 x 2 design, waarbij enerzijds een contrast in sanitaire condities (laag of hoog) wordt opgelegd en anderzijds een contrast in aminozuursamenstelling van het voer (basaal profiel en een aminozuurprofiel met een verhoogd niveau aan methionine, threonine, en tryptofaan).

Hetzelfde contrast in sanitaire condities zal op eenzelfde wijze worden opgelegd als in een eerder uitgevoerd experiment, waaraan wordt gerefereerd in de beschrijving van fase 1 van het project, zoals hieronder nader beschreven. Het voordeel van deze benadering t.o.v. alternatieve benaderingen is dat we een verschil aan konden brengen in een populatie varkens die klinisch gezond waren over een langere tijdsduur. We vonden gedurende het hele groeitraject een consistent verschil in groeiprestaties (ca. 50 g/d), dat gerelateerd was aan een verschil in o.a. pleuritis en aan een verschillende mate van activatie van het immuunsysteem (o.a. haptoglobine en IgG tegen KLH, een lichaamsvreemd antigeen).

Hoge en lage sanitaire conditie dieren zullen van eenzelfde (lage sanitaire conditie) bedrijf worden geselecteerd. Dieren in de proefbehandelingen met de hoge sanitaire conditie krijgen een vaccinatie programma gericht tegen een aantal praktisch relevante agentia en aandoeningen. Dit vaccinatieprogramma loopt over een traject tot 10 weken leeftijd. Vaccins zullen worden toegediend conform bijsluiters van de fabrikanten. Het betreft vaccins tegen: Porcine Circovirus type 2 (circo), Mycoplasma hyopneumoniae (mycoplasma), Actinobacillus pleuropneumoniae (APP), Porcien Reproductief en Respiratoir Syndroom (PRRS), Lawsonia intracellularis (Lawsonia) en influenza. Lage sanitaire conditie dieren zullen geen vaccins toegediend krijgen.

Op ongeveer 4 weken leeftijd zullen zowel lage als hoge sanitaire conditie dieren worden getransporteerd naar het proefbedrijf, waar lage en hoge sanitaire conditie dieren in aparte afdelingen worden gehuisvest. Na transport naar de onderzoeksfaciliteit zal worden gewerkt met deels levende vaccins die via diercontact kunnen worden verspreid. Huisvesting in aparte afdelingen voorkomt deze overdracht van vaccins tussen hoge en lage sanitaire conditie dieren. Daarnaast zullen de hoge sanitaire conditie dieren in een gereinigde en gedesinfecteerde afdeling worden gehuisvest waar een hygiëne protocol voor bezoekers wordt opgelegd (douchen, 48 uur varkensvrij, mondkapje, haarnetje), terwijl lage sanitaire conditie dieren in een afdeling worden gehuisvest waar niet is schoongemaakt en waar varkensmest afkomstig van een ander vleesvarkensbedrijf zal worden verspreid.

Hoge sanitaire conditie dieren zullen bij aankomst op het proefbedrijf eenmalig worden behandeld met een breedspectrum antibioticum en worden ontwormd ter maximale bescherming tegen de mogelijke effecten van "meegenomen" pathogenen van het bedrijf van oorsprong. Lage sanitaire conditie dieren krijgen geen antibioticum en zullen niet worden ontwormd.

Vanaf 10 weken leeftijd zullen lage en hoge sanitaire conditie dieren worden gehuisvest in klimaatrespiratiecellen. Er zijn vier cellen beschikbaar elk bestaande uit twee kamers met hierin een hok met zes dieren. Een hok met zes dieren is de experimentele eenheid in het onderzoek. In verband met de capaciteit van de respiratiecellen wordt het onderzoek in drie experimentele rondes uitgevoerd, waarbij steeds nieuwe dieren met een vergelijkbare herkomst en leeftijd worden aangevoerd.

Hoge sanitaire conditie dieren zullen in grondig gereinigde en gedesinfecteerde cellen worden gehuisvest als onderdeel van hun proefbehandeling. Lage sanitaire conditie dieren zullen in cellen worden gehuisvest die verontreinigd zijn met varkensmest afkomstig van andere bedrijven. Beide groepen varkens zullen drie weken verblijven in de respiratiecellen en zullen één van de twee proefvoerders ontvangen met een onderscheid in aminozuursamenstelling. De samenstelling van de proefvoerders is identiek aan de samenstelling gebruikt in eerder onderzoek.

In de eerste week (adaptatieweek) zal dit dieet onbeperkt verstrekt worden, in de 2^e week beperkt (3 x onderhoudsbehoefte voor energie) en in de 3^e week weer onbeperkt.

De volgende metingen zullen worden uitgevoerd:

In week 1 (adaptatieweek) en 2 zal een energie- en stikstof (N) balansmeting worden uitgevoerd op basis van meting van de in- en uitstroom van de luchtstroom en de samenstelling hiervan (O₂ en CO₂) en de verstrekte hoeveelheid voer en geproduceerde hoeveelheid mest en urine en de samenstelling hiervan.

In week 3 in de cellen, zullen dieren 24 uur gevast worden voor de bepaling van de onderhoudsbehoefte voor energie van de dieren.

Vervolgens zal twee dagen later bij varkens in de helft van de cellen (gelijk verdeeld over behandelingsgroepen) een i.v. challenge via de oorader worden uitgevoerd met LPS waarvan een koortsrespons van max. 12 uur kan worden verwacht. Het effect van de LPS challenge op de energiestofwisseling zal worden gemeten alsmede zal bij deze dieren een novel object test (NOT) uitgevoerd worden om vast te stellen in hoeverre het gedrag van dieren onder condities van LPS challenge wordt beïnvloed door de experimentele behandelingen (sanitaire condities en voersamenstelling). Omdat de keus van een geschikt 'object' voor de test kritisch kan zijn i.v.m. het regelmatig wisselen van afleidingsmateriaal in het hok, zal advies worden ingewonnen over de keuze van het 'object' bij een gedragsexpert met ervaring met de NOT. Een Human approach test is niet mogelijk in dit experiment, dit komt omdat een persoon die de HAT meting zou uitvoeren O₂ en CO₂ verbruikt en produceert wat de warmteproductiemeting als reactie op de LPS challenge zou verstoren.

Na week 3 zullen de LPS gechallengeerde dieren worden geëuthanaseerd. Deze dieren zijn niet geschikt voor humane consumptie en kunnen niet dienen als dieren voor verdere bemonstering van bloed, weefsel en darminhoud i.v.m. mogelijk interferentie van de LPS challenge met de uit te voeren analyses in deze monsters. De niet LPS gechallengeerde dieren zullen worden geëuthanaseerd ter bemonstering van bloed (voor concentraties ontstekingswitten en cytokinen

en het bloedcelprofiel). Daarnaast zal digesta worden verzameld uit verschillende delen van de dunne en dikke darm om microbiota samenstelling te kunnen vaststellen en zullen mucosale schraapsels van de dunne darm worden verzameld voor genexpressie analyses. De longen van de dieren zullen worden gescoord op pleuritis en pneumonie laesies (ontsteking aan longvlies en longzakjes) als maat voor gezondheid.

Tijdens de respiratiecel periode zal mest worden verzameld voor de uitvoering van een eitelling op aanwezigheid van darmwormen. Deze telling wordt gedaan omdat er kans aanwezig is dat onbehandelde dieren worminfecties krijgen, dit is onderdeel van het onderzoek model. In de praktijk zijn worminfecties ook onderdeel van de sanitaire condities van een bedrijf.

Parameters

Performance:

- Energiebalans → week 1 en 2 in de cellen als maat voor kwantitatieve energiestofwisseling
- Stikstofbalans → week 1 en 2 in de cellen als maat voor eiwitretentie in het lichaam
- Groei, voeropname, voederconversie → als maat voor de zoötechnische dierprestatie
- Fasting heat productie → als meting voor energiebehoefte voor onderhoud

Gezondheid en immuun systeem:

- Warmte productie 24 uur na LPS challenge als maat voor de (verandering in) onderhoudsbehoefte voor energie
- Novel object test → als maat voor ziekterespons na LPS challenge
- Long score pleuritis en pneumonia tijdens secties
- Bloedmonsteranalyse op ontstekingsmarkers, cytokinen en bloedcelprofiel
- Mestmonsters voor eitellingen als maat voor worminfecties
- Digesta monsters uit dunne en dikke darm voor microbiota samenstelling
- Genexpressie in darmwandschraapsels als maat voor activiteit van lokale immuunsysteem in de darm

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.

- Groep 1. hoge sanitaire conditie (13 weken) en basis aminozuur dieet (4 weken)
- Groep 2. hoge sanitaire conditie (13 weken) en gesupplementeerd aminozuur dieet (4 weken)
- Groep 3. lage sanitaire conditie (13 weken) en basis aminozuur dieet (4 weken)
- Groep 4. lage sanitaire conditie (13 weken) en gesupplementeerd aminozuur dieet (4 weken)
- Groep 5. LPS challenge, novel object test, warmteproductie als maat voor koorts (duur ongeveer 12 uur)
- Groep 6. Fasting heat production (duur 24 uur)
- Groep 7. Euthanasie
- Groep 8. Euthanasie en sectie

Het grootste deel van de varkens valt onder meerdere "behandelingsgroepen" (groep 1 tot 8, zoals hierboven aangeduid). Alle varkens vallen in een van de groepen 1 t/m 4, allen in groepen 6 en 7. De helft van de dieren valt in groep 5 en de andere helft in groep 8.

Groep 9. 36 reservedieren, verdeeld over drie experimentele rondes, worden aangevoerd op speenleeftijd (4 weken). Deze zijn gelijk verdeeld over beide sanitaire statussen (laag/hog) (zes dieren per ronde per status). Deze dieren worden aangevoerd om homogene experimentele eenheden (groepen van 6 dieren in een hok) te kunnen formeren en te kunnen anticiperen op uitval van dieren in de eerste weken na aanvoer op de proefaccommodatie. Op het moment van de start van verstrekking van de proefvoerders zullen niet gebruikte reservedieren uit de studie worden genomen.

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

Het aantal dieren en aantal herhalingen is gebaseerd op gegevens en resultaten uit onderzoek waarin gebruik is gemaakt van hetzelfde contrast in sanitaire status, een statistische powerberekening in SAS 9.3 uitgaande van voldoende homogene experimentele eenheden bestaande uit hokken met elk zes dieren en specifieke overwegingen gerelateerd aan de setting van de te gebruiken experimentele faciliteiten.

B. De dieren

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

In totaal zullen 144 varkens (excl. reservedieren) in de studie worden betrokken. De dieren zijn gehuisvest in groepen van 6 in een hok (= experimentele eenheid) en er zijn 4 behandelingen (twee sanitaire condities en twee proefvoerders met een verschillende aminozuursamenstelling). Elke proefbehandeling wordt met zes herhalingen uitgevoerd. Dus in totaal 6 varkens x 4 behandelingen x 6 = 144 dieren. Omdat het van belang is dat het onderzoek met klinisch niet afwijkende en voldoende homogene groepen dieren voor wat betreft lichaamsgewicht wordt uitgevoerd worden additioneel 36 reservedieren (6 per sanitaire status behandelingsgroep per ronde) aangevoerd. In totaal worden er dus 180 dieren op speenleeftijd naar het proefbedrijf vervoerd en hieruit zullen 144 dieren worden geselecteerd op het moment dat de voerbehandelingen worden opgelegd (een week voorafgaand aan overplaatsing van de dieren naar de respiratiecellen). De niet verder in de studie te gebruiken reservedieren worden overgedragen aan de proefaccommodatie voor verdere reguliere opfok.

Een groep van 6 varkens wordt gezien als experimentele eenheid om de volgende twee redenen:

- Het aantal van 6 dieren per hok is vastgesteld omdat dit aantal dieren (van 25-40 kg) minimaal nodig is voor voldoende productie en verbruik van CO₂ en O₂ in de klimaat respiratie kamer (2 kamers per cel). Een kleiner diervolume (metabole massa) geeft onvoldoende betrouwbare resultaten. Gebruik van minder, doch zwaardere dieren is geen optie i.v.m. een verwachte ongewenste langere doorlooptijd van de studie met mogelijk negatieve consequenties voor de homogeniteit van de dieren bij aanvang van de respiratiemetingen en resulterende grotere variatie tussen experimentele eenheden.
- Bezettingsdichtheid heeft naar verwachting invloed op het experimentele contrast (de effecten van sanitaire status). Zes dieren per hok maakt een hokbezetting van 1 dier per 0.8 m² hetgeen vergelijkbaar is met omstandigheden op praktijkbedrijven.

Het aantal herhalingen per proefbehandeling is bepaald met behulp van een statistische poweranalyse in SAS 9.3. Deze analyse is uitgevoerd met gegevens uit een eerder experiment (beschreven in fase 1 projectaanvraag) met een vergelijkbaar contrast in gezondheidsstatus en contrast in aminozuren in voer.

Omdat voor het onderhavige experiment voederconversie wordt gezien als een belangrijke indicator voor energiebenutting uit het voer, zijn gegevens van deze parameter uit het vorige experiment gebruikt als uitgangspunt voor de poweranalyse. Wanneer men uitgaat van een residuele standaarddeviatie van 0.14 en gemiddelden van 2.08, 1.85, 1.94, 1.74 voor de 4 behandelingen dan volgt er een n=5 als minimaal benodigd aantal experimentele herhalingen per proefbehandeling, uitgaand van de experimentele condities in het voorgaande experiment.

Het uiteindelijk in onderhavige studie benodigd aantal experimentele herhalingen is vastgesteld op zes per proefbehandeling op basis van bovenstaande en rekening houdend met onderstaande punten:

- Een experimentele eenheid in de uit te voeren studie bestaat uit 6 dieren en in de eerder uitgevoerde studie bestond uit 9 dieren in een hok.
- De duur van de meetperiode in de huidige studie is korter dan in de meetperiode in voorgaande studie (drie i.p.v. vijf weken) waarop de poweranalyse is gebaseerd.

Voor andere primaire

Er is gekozen voor het varken omdat het in deze studie het doeldier betreft. Gebruik van andere diersoorten zou niet tot praktisch bruikbare gegevens leiden, omdat er gezocht wordt naar verschillen in de nutriëntenbehoeften van het varken bij verschillende gezondheids-/sanitaire condities om tot verbeteringen te komen voor adviezen t.a.v. nutriëntsamenstelling van voeders

in afhankelijkheid van de status van bedrijven. Er is gekozen voor het gebruik van vrouwelijke dieren om te kunnen werken met meer homogene groepen dieren (experimentele eenheden) en een eventueel interfererend effect van sexe op de resultaten van de studie uit te sluiten.

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: Het varken is het doeldier in deze proef. Onderzoeksresultaten dienen geschikt te zijn om te gebruiken voor aanpassingen van voersamenstellingen in de praktijk. De interactie tussen gezondheidsstatus en de energiebehoefte van het varkens kan niet met behulp van *ex vivo* of *in vitro* technieken worden vastgesteld.

Verfijning:

In dit experiment worden dieren drie weken gehuisvest in respiratiecellen. In eerder uitgevoerd onderzoek met dit model t.a.v. sanitaire status werd een meetperiode van minimaal 5 weken toegepast. De meetperiode kan worden verkort van 5 naar 3 weken in het huidige experiment omdat we verwachten de effecten van proefbehandelingen op de responsparameters nauwkeuriger te meten in onderzoek in respiratiecellen op een proefbedrijf dan in een praktijksetting zoals in eerder uitgevoerd onderzoek.

Vermindering: Het aantal te gebruiken dieren in de studie is geminimaliseerd met inachtneming van het minimale aantal benodigde dieren voor het statistisch significant aantonen van verschillen tussen proefbehandelingen voor wat betreft de primaire respons 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.

Varkens worden gehuisvest in groepen en niet individueel om ongerief bij de dieren te beperken. De hokken worden voorzien van afleidingsmateriaal zoals kettingen en emmers om verveelgedrag te beperken. Dit materiaal zal regelmatig worden vervangen voor nieuw materiaal.

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.

Een vergelijkbare dierproef is voor zover bekend niet eerder uitgevoerd. Hiervoor is uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd in fase 1.

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

x 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.

De dieren worden volgens deze bijlage gehouden met uitzondering van de volgende 3 punten:

Punt 1.2.a: Hierin staat vermeld dat dierverblijven geregeld schoon moeten worden gemaakt. Voor de lage sanitaire conditie varkens zal dit niet gebeuren als onderdeel van het genereren van het experimentele contrast ten aanzien van sanitaire status. Het verspreiden van "vreemde" mest wordt vaker toegepast in onderzoek om het immuunsysteem van dieren te activeren zonder dat dit leidt tot klinisch zieke dieren.

We verwachten dat dit geen extra ongerief zal geven, aangezien we in een eerder experiment een vergelijkbare strategie (incl. mest verspreiden) hebben gebruikt dat niet leidde tot een toename in klinische gezondheidsproblemen bij de dieren.

Punt 3.4.d: Hierin staat dat dieren toegang moeten hebben tot de voederbak. Als onderdeel van de strategie om nauwkeurig te meten is het van belang dat dieren in de 2^e week in de respiratiecellen beperkt worden in voeropname. Dit zal een matige beperking betreffen waardoor geen extra ongerief als gevolg hiervan wordt verwacht.

Voor de meting van "fasting heat productie" is het van belang dat dieren 24 uur gevast worden. Als gevolg hiervan wordt matig ongerief verwacht.

Punt 3.6.a: Hierin staat dat de dieren altijd moeten beschikken over geschikt bedding materiaal. Dieren in dit experiment zullen geen bedding materiaal tot hun beschikking krijgen omdat ze dit bedding materiaal kunnen opeten en dit de resultaten van de het experiment ongewenst zal beïnvloeden.

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.

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

In de eerste vier weken na geboorte zullen de varkens gehuisvest zijn op een commerciële varkenshouderij. In deze 4 weken zullen de dieren volgens de procedure van dat varkensbedrijf worden verzorgd. De helft van de varkens krijgt in de 1^e levensweek een combi vaccinatie met (Mycoplasma en Circo, conform bijsluiters van de vaccins). Deze wordt vaker toegepast in de praktijk. Op 4 weken leeftijd (speenleeftijd) zullen de dieren worden verplaatst naar het proefbedrijf. Van vier tot tien weken leeftijd zullen de varkens worden gehuisvest per 6 dieren in hokken met een beschikbare oppervlakte van 0.8 m² per varken op dit geregistreerde proefbedrijf. Vanaf 10 tot en met 13 weken leeftijd zullen de varkens worden gehuisvest in de klimaat respiratiecellen op hetzelfde proefbedrijf in groepen van 6 dieren per hok (0.8 m²/varken).

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

De wijze van huisvesting maakt deel uit van de experimentele behandeling (sanitaire status), dus hiervoor is bewust voor gekozen. Het is belangrijk voor het onderzoek dat dieren eenzelfde oorsprong (gezondheidsstatus bedrijf van herkomst) hebben om het experiment te laten slagen. Een gezondheidsstatus contrast creëren d.m.v. het selecteren van twee verschillende gezondheidsstatus bedrijven bleek niet succesvol in eerder onderzoek door Kampman - van de Hoek (2013). Om vanuit eenzelfde gezondheidsstatus bij geboorte een contrast te creëren in

sanitaire/gezondheidsstatus tijdens de meetperiode is de strategie zoals in deze aanvraag beschreven nodig. Uit eerder onderzoek blijkt de aanpak zoals beschreven in dit voorstel succesvol om een contrast in subklinische gezondheidsstatus te creëren.

Vanaf 4 weken leeftijd zullen de dieren worden gehuisvest conform de richtlijnen voor een dierproef (m.u.v. de 3 punten genoemd bij F) en dus ook de bijhorende verzorging krijgen door gecertificeerd personeel. In de 4 weken daarvoor worden de dieren verzorgd volgens de procedure van het varkensbedrijf van herkomst en hier zal als extra regelmatig toezicht worden gehouden door WOD gecertificeerd personeel.

Referentie

Kampman-van de Hoek, E., Gerrits, W. J. J., van den Borne, J. J. G. C., van der Peet-Schwering, C. M. C., & Jansman, A. J. M. (2013). Amino acid requirements of growing-finishing pigs with a different health status. In Proceedings of the Wias Science Day 2013, 28 Februari 2013, Wageningen, the Netherlands (pp. 9-9).

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.

Pijnverlichting is niet aan de orde in deze studie.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De systemische toediening van LPS bij een deel van de varkens leidend tot een kortdurende koortsrespons (<12 uur) geeft licht ongerief. Het risico op complicaties als gevolg van de toediening van LPS wordt als gering ingeschat, mede op basis van de ervaringen in een eerder experiment.

De Novel object test na LPS challenge kan beperkte stress veroorzaken bij de dieren die deze test ondergaan.

Fixatie van de dieren bij LPS challenge en het vasten gedurende 24 uur kunnen ook leiden tot enige stress. Bloed voor bloedparameters wordt afgenomen na euthanasie dus leidt niet tot additioneel ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bij de Novel object test wordt een onbekend voorwerp geïntroduceerd in het hok varkens en wordt de gedragsrespons hierop gemeten. Een bal of een vergelijkbaar plastic voorwerp zal worden gebruikt als 'novel object'. Het novel object is nieuw voor de dieren en daarom kan dit onbekende voorwerp enige kortdurende stress veroorzaken.

Het fixeren van varkens, het toedienen van LPS en het 24 uur vasten kan enige stress veroorzaken.

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

Er worden geen specifieke maatregelen genomen ter bestrijding van stress of ongerief. Uit eerder onderzoek waarbij vergelijkbare handelingen zijn verricht zijn geen problemen ontstaan. De dieren worden frequent gecontroleerd in de periode na de LPS challenge. Mochten zich toch

complicaties voordoen tijdens of na challenge dan zal in overleg met de betrokkenen en een veterinaire worden besloten tot eventuele maatregelen.

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.

xJa > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Wanneer dieren in de studie klinisch ziek worden, zal in overleg met een dierenarts worden bepaald of en hoe het dier behandeld dient te worden ter bevordering van herstel, dan wel, afhankelijk van de ernst en duur van de gezondheidsproblemen uit de studie dient te worden genomen en te worden geëuthanaseerd.

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

<2%

K. Classificatie van ongerief

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

Lage gezondheidsstatus behandeling wordt gezien als licht ongerief omdat deze dieren worden onthouden van vaccinaties en ontwormingskuur en een hogere kans hebben op het optreden van ziekte.

Ongerief t.g.v. 24 uur vasten

- Matig op basis van onderzoek in het verleden

Ongerief t.g.v. de LPS challenge bij deze dieren bestaat uit

- I.v. injectie (inclusief fixatie dieren)
- Koortsreactie
 - Licht

-Ongerief t.g.v. dieren die na de proef gedood worden met pentobarbitaal en gebruikt zullen worden voor sectie.

- Licht

Omdat alle dieren alle bovenstaande behandelingen doorlopen, of alle behandelingen m.u.v. de LPS challenge die wordt toegepast op de helft van de dieren, wordt het cumulatieve ongerief van alle dieren ingeschat op matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Een deel van de dieren zal worden gedood aan het einde van de proef om sectie te kunnen verrichten op deze dieren. De andere helft van de dieren wordt geëuthanaseerd en is niet geschikt voor sectie en nadere monsterverzameling in het kader van de studie of aanbieden op het slachthuis voor uiteindelijke consumptie door de mens i.v.m. de systemische toediening van LPS bij deze dieren. De reservedieren die overblijven (maximaal 36) zullen uiteindelijk worden geleverd aan het slachthuis.

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.	40100	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Validatie experiment op een vleesvarken praktijkbedrijf

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.

Proefbehandelingen: In dit experiment is gekozen voor een 2x4 factoriële opzet (lage of hoge gezondheidsstatus x contrast in nutriëntsamenstelling van het voer) waarbij in totaal 700 dieren gebruikt worden. De dieren worden gehuisvest in groepshokken in een praktijk conforme setting.

Dieren worden na geboorte geselecteerd bij een commercieel bedrijf en op 10 weken leeftijd zullen de dieren worden getransporteerd naar de praktijkstal waar de proef wordt uitgevoerd.

Hetzelfde contrast in sanitaire condities zal hetzelfde worden opgelegd als in een eerder uitgevoerd onderzoek, waaraan wordt gerefereerd in de beschrijving van fasen 1 en 2 van het project, zoals hieronder nader beschreven.

Hoge en lage sanitaire conditie dieren zullen van eenzelfde (lage sanitaire conditie) bedrijf worden geselecteerd. Dieren worden dus gekocht bij één vermeerderaar met één sanitaire conditie.

Dieren in de proefbehandelingen met de hoge sanitaire conditie krijgen een vaccinatie programma gericht tegen een aantal praktijk relevante agentia en aandoeningen. Dit vaccinatieprogramma loopt over een traject tot 10 weken leeftijd. Vaccins zullen worden toegediend conform bijsluiters van de fabrikanten. Het betreft vaccins tegen: Porcine Circovirus type 2 (circo), Mycoplasma hyopneumoniae (mycoplasma), Actinobacillus pleuropneumoniae (APP), Porcine Reproductief en Respiratoir Syndroom (PRRS), Lawsonia intracellularis (Lawsonia) en influenza. Lage sanitaire conditie dieren zullen geen vaccins toegediend krijgen.

Vanaf spenen op het bedrijf van oorsprong (ongeveer 4 weken leeftijd) zal worden gewerkt met

deels levende vaccins die via diercontact kunnen worden verspreid. Huisvesting in aparte afdelingen voorkomt deze overdracht van vaccins tussen hoge en lage sanitaire conditie dieren. Op ongeveer 10 weken leeftijd zullen zowel lage als hoge sanitaire conditie dieren in aparte wagons worden getransporteerd naar het proefbedrijf, waar lage en hoge sanitaire conditie dieren in aparte afdelingen worden gehuisvest. Daarnaast zullen de hoge sanitaire conditie dieren in een gereinigde en gedesinfecteerde afdeling worden gehuisvest waar een hygiëne protocol voor bezoekers wordt opgelegd (douchen, 48 uur varkensvrij, mondkapje, haarnetje), terwijl lage sanitaire conditie dieren in een afdeling worden gehuisvest waar niet is schoongemaakt en waar varkensmest afkomstig van een ander vleesvarkensbedrijf zal worden verspreid. Hoge sanitaire conditie dieren zullen bij aankomst op het proefbedrijf eenmalig worden behandeld met een breedspectrum antibioticum en worden ontwormd ter maximale bescherming tegen de mogelijke effecten van "meegenomen" pathogenen van het bedrijf van oorsprong. Lage sanitaire conditie dieren krijgen geen antibioticum en zullen niet worden ontwormd.

Alle te evalueren rantsoenen in het experiment zullen nutritioneel zodanig van samenstelling zijn dat verstrekking ervan geen ongerief zal opleveren voor de dieren. Nadere invulling van het contrast in voersamenstelling vindt plaats op basis van de resultaten van het onderzoek uitgevoerd in fase 2.

Parameters

De voeropname, groei en voederconversie van de dieren zijn belangrijke responsparameters in de studie. Deze worden bepaald door vaststelling van de voeropname per hok en regelmatige vaststelling van het lichaamsgewicht van de dieren. Weging van dieren vindt plaats bij binnenkomst en bij overgang naar de verschillende fasen in het groeitraject (start, groei en –eindfase, elk met een looptijd van ongeveer 35 dagen). Op de weegmomenten vindt ook terugweging van het voer per hok plaats.

Daarnaast zal om verschillen m.b.t. gezondheidsstatus te kunnen vaststellen, vier keer in de gehele proefperiode bloed worden afgenomen via punctie van de Vena jugularis bij twee dieren per hok. In de bloedmonsters worden o.a. ontstekingsmarkers, cytokinen en bloedcelprofiel bepaald en zal serologisch onderzoek naar contact met een aantal specifieke pathogenen worden uitgevoerd.

Om het effect van dieet en gezondheidsstatus op een koorts- en immuunrespons te kunnen vaststellen is gekozen voor het i.v. toedienen van LPS bij een deel van de dieren (één dier per hok) op één moment en het meten van de koorts-, immunologische en gedragsrespons op deze toediening. De toediening zal vergelijkbaar zijn met in het onderzoek in fase 2 van het project en leidt naar verwachting tot een koortsrespons van max. 12 uur. De dieren worden op de dag van en de dag voor de challenge rectaal getemperatuurd (op t=-1 uur, 1, 3, 6 en 8 uur na challenge). Verder wordt nog eenmaal op de dag na challenge getemperatuurd.

In de periode direct volgend op de LPS challenge wordt een human approach test uitgevoerd en de tijd tot aanraken van een onbekende persoon die het hok binnenstapt wordt bepaald. Deze test wordt uitgevoerd op de dag voor challenge eenmaal, en op t=-1 uur, 1, 3, 6, 8 uur na challenge en eenmaal op de dag erna. In het experiment beschreven in fase 2 van het project wordt een novel object test gebruikt i.p.v. een human approach test omdat een human approach test niet kan worden uitgevoerd in respiratiekamers i.v.m. interferentie met de energiemetabolisme metingen.

In de studie zal de fecale nutriënt verteerbaarheid van de voeders worden gemeten op basis van analyses van de samenstelling van voer- en mestmonsters. Per fase worden rectaal mestmonsters verzameld van varkens van 5 hokken per proefbehandeling op drie opeenvolgende dagen. Deze mest wordt tevens gebruikt voor de uitvoering van een eitelling op aanwezigheid van darmwormen. Deze telling wordt gedaan omdat er kans aanwezig is dat onbehandelde dieren worminfecties krijgen, dit is onderdeel van het onderzoek model. In de praktijk zijn worminfecties

ook onderdeel van de sanitaire condities van een bedrijf. In de proefvoerders zal een markeerstof worden opgenomen ten behoeve van de bepaling van de nutriëntverteerbaarheid.

Op het einde van het experiment kunnen de varkens worden geleverd aan het slachthuis en zijn geschikt voor humane consumptie, met uitzondering van de varkens die een LPS challenge hebben ondergaan.

Literatuur

- Le Floch, N., L. LeBellego, J. J. Matte, D. Melchior, and B. Sève. 2009. The effect of sanitary status degradation and dietary tryptophan content on growth rate and tryptophan metabolism in weaning pigs. *J. Anim Sci.* 87(5): 1686-1694.
- Pastorelli, H., Le Floch, N., Merlot, E., Meunier-Salaün, M.C., van Milgen J., Montagne L. 2012. Sanitary housing conditions modify the performance and behavioural response of weaned pigs to feed- and housing-related stressors. *Animal* 6 (11): 1811-1820.
- Williams, N. H., T. S. Stahly, and D. R. Zimmerman. 1997. Effect of chronic immune system activation on the rate, efficiency, and composition of growth and lysine needs of pigs fed from 6 to 27 kg. *J. Anim Sci.* 75(9): 2463-2471.

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.

Behandeling 1 lage sanitaire status, dieet 1
Behandeling 2 lage sanitaire status, dieet 2
Behandeling 3 lage sanitaire status, dieet 3
Behandeling 4 lage sanitaire status, dieet 4
Behandeling 5 hoge sanitaire status, dieet 1
Behandeling 6 hoge sanitaire status, dieet 2
Behandeling 7 hoge sanitaire status, dieet 3
Behandeling 8 hoge sanitaire status, dieet 4
Behandeling 9 bij dieren van behandeling 1 t/m 8 LPS toediening (uit elk hok één dier)

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

Het aantal dieren in de studie is berekend met behulp van een statistische poweranalyse en gegevens van onderzoek uit een eerdere studie met een vergelijkbare proefopzet zoals beschreven onder fase 1 van het project.

B. De dieren

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

In totaal zullen 700 dieren gebruikt worden in de proef, gelijk verdeeld over de twee niveaus van sanitaire/gezondheidsstatus. De dieren zullen worden gevolgd vanaf 10 weken leeftijd tot aan slacht op ongeveer 25 weken leeftijd.

Voederconversie wordt beschouwd als een belangrijke uitleesparameter en de gemiddelden waarden voor de behandelingsgroepen in het onderzoek aangeduid onder fase 1 van het project waren 2.36; 2.27; 2.2; 2.13; 2.22; 2.25; 2.1; 2.06. De standaarddeviatie was 0.19. Uitgaande van een vergelijkbare opzet in aantallen behandelingen (2 niveaus van gezondheidsstatus en 4 verschillende proefvoerders) resulteert de powerberekening met een alfa van 0.05 in acht herhalingen per experimentele behandeling. Uitgaande van 9 dieren per hok (vergelijkbaar met proef uit exp. fase 1) zijn er $9 \times 8 = 72$ hokken nodig $\times 9$ dieren per hok = 648 varkens. Negen dieren per hok is gekozen omdat er uitgegaan wordt van eenzelfde hokbezetting als in experiment 1, 0.8 m^2 per dier in hokken van 7.2 m^2 .

Om voldoende klinisch gezonde en voldoende homogene groepen dieren op een leeftijd van 10 weken te kunnen plaatsen zal een groter aantal dieren (130 dieren; 20% van het totaal uiteindelijk aantal benodigde dieren) in de voorperiode, van geboorte tot opleg, al dan niet het

vaccinatie regime ondergaan, als onderdeel van het behandelingscontrast "sanitaire status". Voorgaande houdt rekening met 1. uitval van dieren in de eerste 10 levensweken 2. selectie op 10 weken leeftijd van uitsluitend klinisch gezonde dieren en 3. biedt de mogelijkheid tot het vormen van, voor wat betreft lichaamsgewicht, zo homogeen mogelijke groepen dieren bij plaatsing op 10 weken leeftijd, door het uiteindelijk niet selecteren van dieren met een laag ("achterblijvers") en een hoog lichaamsgewicht in de beschikbare populatie dieren. Uiteindelijk zullen niet geselecteerde, niet geplaatste dieren conform praktijk worden grootgebracht.

Het varken is het doeldier in het project. Gebruik van andere diersoorten zou niet tot praktisch bruikbare gegevens leiden, omdat er gezocht wordt naar verschillen in de nutriëntenbehoeften van het varken bij verschillende gezondheids-/sanitaire condities om tot verbeteringen te komen voor adviezen t.a.v. nutriëntsamenstelling van voeders in afhankelijkheid van de status van bedrijven. Er worden alleen vrouwelijke dieren gebruikt om een eventueel effect van en variatie veroorzaakt door gebruik van dieren van beide sexen uit te sluiten. De interactie tussen gezondheidsstatus en de energie, eiwit en aminozuurbehoefte van varkens kan niet met behulp van *ex vivo* of *in vitro* technieken worden bepaald.

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: Het varken is het doeldier in deze proef, aangezien het project kan leiden tot een eventuele aanpassing van de voersamenstelling voor varkens in de praktijk kan het onderzoek niet met een andere diersoort worden uitgevoerd. De interactie tussen gezondheidsstatus en nutriëntbehoeften van varkens kan niet met behulp van *ex vivo* of *in vitro* technieken worden bepaald.

Verfijning: Er is advies ingewonnen van deskundigen m.b.t. de aard en procedure van de te gebruiken LPS challenge. Er is gekozen voor een LPS dosis die leidt tot een kortdurende koorts respons. De dosis is dezelfde als gebruikt in eerder onderzoek (zie fase 1) en onderzoek in fase 2 van het project.

Vermindering: Het aantal te gebruiken dieren is zodanig vastgesteld en beperkt, dat verwachte effecten van de proefbehandelingen op de primaire responsparameters statistisch significant kunnen worden aangetoond.

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

De hokken worden voorzien van afleidingsmateriaal zoals kettingen en/of emmers om verveelgedrag te beperken. Dit materiaal zal regelmatig worden vervangen door nieuw materiaal.

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.

Deze dierproef is voor zover bekend eerder uitgevoerd. Hiervoor is uitgebreid literatuuronderzoek gedaan in fase 1.

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

x 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.

De dieren worden volgens deze bijlage gehouden met uitzondering van de volgende 3 punten:

Punt 1.2.a: Hierin staat vermeld dat dierverblijven geregeld schoon moeten worden gemaakt. Voor de lage gezondheidsstatus varkens zal schoon maken van hokken niet plaats vinden omdat dit zou interfereren met het beoogde contrast in sanitaire status dat is opgelegd als proeffactor in de studie.

Punt 3.6.a: Hierin staat dat de dieren altijd moeten beschikken over geschikt bedding materiaal. Dieren in dit experiment zullen geen beddingmateriaal tot hun beschikking krijgen omdat ze dit materiaal zouden kunnen opeten en dit de resultaten van het experiment ongewenst zou kunnen beïnvloeden.

Tabel 7.3 De hokoppervlakte van varkens tot 100 kg in een dierproef moet minimaal 1 m² per dier zijn. De beschikbare oppervlakte zal 0.8 m² per dier zijn in het experiment op het bedrijf waar het experiment wordt uitgevoerd. Dit is conform huisvestingseisen voor praktijkbedrijven voor dieren met een gewicht van maximaal 110 kg. Het bedrijf waar de studie wordt uitgevoerd geldt als praktijkbedrijf. Huisvesting conform praktijknormen is tevens van belang voor de studie vanwege het feit dat bezettingsdichtheid invloed kan hebben op de effecten van sanitaire status (een lagere hokbezetting zou de effecten van sanitaire status kunnen verkleinen). Daarnaast geldt dat resultaten van het validatieonderzoek geldigheid moeten hebben voor de varkenshouderij praktijk in Nederland en West Europa. Het uitvoeren van het onderzoek conform praktijkcondities is hierbij van belang.

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.

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

Dit experiment zal worden uitgevoerd in een praktijkstal. De huisvesting zal voldoen aan de eis van aanwezige oppervlakte van min. 0.8 m² per dier en de verzorging zal worden uitgevoerd door gecertificeerd personeel of door personeel waar een ontheffing voor wordt aangevraagd bij de nVWA. Met behulp van de hokbezetting conform praktijk setting wordt het draagvlak voor praktische implementatie van de resultaten van het onderzoek vergroot.

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

Er is gekozen voor een commerciële praktijkstal om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden onder praktijkomstandigheden. Het is een validatie experiment waarbij aangepaste voeders worden geëvalueerd en waarbij de resultaten de basis kunnen vormen voor

voeraanpassingen in de varkenshouderij praktijk, rekening houdend met variatie in sanitaire en gezondheidsstatus van vleesvarkensbedrijven.

Om te zorgen voor adequate verzorging en behandeling van de dieren in de studie wordt personeel ingezet dat hier de benodigde certificering voor heeft. Voor de veehouder zal een vrijstelling worden aangevraagd bij de nVWA om de dagelijkse verzorging van de dieren in het onderzoek te mogen uitvoeren.

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?

Fixatie bij en i.v. toediening van LPS en de uitvoering van de Human Approach test na LPS toediening zou enige stress en licht ongerief kunnen veroorzaken bij de varkens.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bij de human approach test stapt een voor de varkens onbekend persoon na challenge in het hok. Het fixeren van varkens, het toedienen van LPS en bloedtappen kan stress veroorzaken.

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

Er worden geen specifieke maatregelen genomen in de studie. Uit eerder onderzoek waarbij vergelijkbare handelingen zijn verricht zijn geen problemen ontstaan. De dieren worden regelmatig visueel gecontroleerd in de periode na LPS challenge. Mochten zich toch complicaties voordoen tijdens of na de LPS challenge dan zal in overleg met de betrokkenen en een veterinaire worden besloten welke maatregelen er worden genomen.

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.

Wanneer dieren in de studie klinisch ziek worden, zal in overleg met een dierenarts worden bepaald of en hoe het dier behandeld dient te worden ter bevordering van herstel, dan wel, afhankelijk van de ernst en duur van de gezondheidsproblemen uit de studie dient te worden genomen en te worden geëuthanaseerd.

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

<2%

K. Classificatie van ongerief

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

Lage gezondheidsstatus behandeling wordt gezien als licht ongerief omdat deze dieren worden onthouden van vaccinaties en ontwormingskuur en een hogere kans hebben op het optreden van ziekte.

Ongerief t.g.v. de LPS challenge bij deze dieren bestaat uit

- I.v. injectie (inclusief fixatie dieren)
- Koortsreactie op LPS
- Mogelijk stress door meten lichaamstemperatuur
- **licht**

Het afnemen van bloedmonsters via aanprikken van de halsader wordt als licht ongerief beoordeeld. Viermaal tijdens de proefperiode (\pm 16 weken) wordt er bloed bemonsterd uit de Vena jugularis d.m.v. punctie. Hierbij worden de dieren kort gefixeerd

- Ongerief t.g.v. dieren die na de proef gedood worden bij het slachthuis
- Licht

Ongerief ten gevolge van het rectaal bemonsteren (3 keer in 16 weken) van de dieren voor mest
Licht

Cumulatief:

- Groep met LPS challenge en mestmonsternamen \rightarrow Matig ongerief
- Groep met bloedmonsternamen 4 keer en mestmonsternamen \rightarrow 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.

Dieren worden aan het eind van het experiment geleverd aan het slachthuis en het resulterende vlees is geschikt voor humane consumptie. In het slachthuis zullen longen worden verzameld voor beoordeling van aanwezigheid van visuele longafwijkingen.

De LPS-gechallengde dieren zullen worden geëuthanaseerd op het einde van de studie omdat deze niet geschikt zijn voor humane consumptie.

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



Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte heer, mevrouw,

Onderstaand het advies van de DEC aangaande het project:

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002015123**
2. Titel van het project: **Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens**
3. Titel van de NTS: **De invloed van hygiënestatus op de energie- en eiwitbehoefte van varkens**
4. Type aanvraag: **nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
DEC-DLO
[Redacted]
Secretaris: [Redacted]
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 14-06-2015
Aanvraag compleet: 14-06-2015
In vergadering besproken: 01-07-2015
8. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 06-07-2015
Strekking van de vragen:
 - De DEC heeft geadviseerd om het project na te lopen op taal en spelling
 - De DEC heeft vragen gesteld over:
 - De herkomst van de mest en het risico op ziekte-insleep
 - De bruikbaarheid van de Novel Object Test (NOT)
 - De leeftijd van de dieren: zijn er minder dieren nodig wanneer gebruik gemaakt wordt van zwaardere dieren
 - Vergelijkbaarheid en verband tussen beide proeven, met name voor wat betreft de gebruikte stress-test
 - Rechtvaardigt het aantal in te zetten reservedieren de uitval en wat gebeurt er met de reservedieren die niet in de experimenten ingezet worden

Dierexperimenten
Commissie WUR

DATUM
5 augustus 2015

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002015123

LW KENMERK
AVD 401002015123

POSTADRES
Postbus 65
8200 AB Lelystad

BEZOEKADRES
[Redacted]

INTERNET
www.wageningenUR.nl

KVK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[Redacted]

TELEFOON
[Redacted]

E-MAIL
[Redacted]

- o Reden waarom gekozen wordt voor een experiment onder praktijkomstandigheden (waarbij niet voldaan wordt aan de Wod-eisen voor wat betreft dierruimte)

Datum antwoorden: 16-07-2015, 24-07-2015 en 29-07-2015
De strekking van de antwoorden is:

- o Dat er inderdaad door de mest kans op ziekte insleep is (bijvoorbeeld een worminfectie), maar dat dit onderdeel is van het onderzoeksmodel.
- o Dat er over de NOT van tevoren contact zal worden opgenomen met een gedragsdeskundige en dat t.z.t. in het proefplan de wijze van uitvoer van de NOT zal worden aangegeven.
- o Dat minder dieren niet gewenst zijn omdat een lagere hokbezetting dan zal afwijken ten opzichte van de situatie op praktijkbedrijven.
- o Dat in de eerste dierproef vanwege de proefomstandigheden (respiratiekamers) geen human approach test (HAT) uitgevoerd kan worden en een Novel Object Test uitgevoerd (NOT) zal moeten worden.
- o Dat reservedieren nodig zijn omdat het van het grootste belang is dat het onderzoek wordt uitgevoerd met klinisch niet afwijkende en voldoende homogene groepen, en dat de reservedieren die niet ingezet worden in de experimenten verder volgens bestaande routine opgefokt en later afgeleverd zullen worden naar een slachthuis.
- o Dat het verschil tussen de eerste en de tweede dierproef juist het verschil tussen experimentele en praktijkomstandigheden is en dat daarom de hokbezetting afwijkt ten opzichte van de eisen van de Wod.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. Het reële belang van het project, te weten het in kaart brengen van de voedingsbehoefte van gezonde maar wel (immunologisch) belaste varkens zodat de voeding beter afgestemd kan worden op de behoefte, wordt door de DEC onderschreven.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: De dieren in dierproeftype 2 worden gehouden buiten een proefdierinstelling, bij een commerciële praktijkstal waarbij niet voldaan wordt aan de huisvestingseisen zoals die door de Wod zijn gesteld. De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "moderate" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit bloedafname, LPS-test, stress-test en hantering.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Vanwege bruikbaarheid in de praktijk is het project niet anders dan in het doeldier uit te voeren.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Door statistische analyse wordt het aantal proefdieren tot een minimum beperkt. De aanvrager beschikt door literatuuronderzoek over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC erkent dat niet op alle punten voldaan kan worden aan de eisen die de Europese Richtlijn voorschrijft en volgt hierin de argumenten die de onderzoeker in het projectplan onder F aangeeft. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
11. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

DATUM
5 augustus 2015

PAGINA
3 van 4

D. Ethische afweging

- De DEC is unaniem van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. De DEC is van mening dat dit project een oplossing kan bieden voor de korte termijn, maar dat het op lange termijn geen oplossing biedt. Met het gebruik van dergelijke supplementen wordt kwalitatief minder goed voer en suboptimaal zoötechnisch management (leidend tot subklinische gezondheidsaantasting) gecompenseerd, waardoor de huidige situatie met een lagere kwaliteit aan management en basisvoer in stand blijft. Wanneer de kwaliteit van het normale voer en het management hoger zou zijn dan zou er in de ogen van de DEC geen behoefte zijn aan een dergelijk additief. Enerzijds kan gesteld worden dat de massale bio-industrie moeilijk te vervangen is en dat additieven dan een middel zijn om de huidige situatie te verbeteren, maar anderzijds zijn er ook veel mensen die de grootschalige productie wil verminderen. Een grote groep in de maatschappij wil echter niet meer betalen voor duurzamer vlees en verschaft zich de legitimiteit om daar dieren voor op te offeren. Mondiaal gezien exporteert Nederland veel vlees dus ook economische belangen spelen een rol in de ethische afweging. De vraag rijst of men in Nederland de massaproductie in stand moet houden voor het buitenland terwijl in die landen het platteland leeg loopt.

Geconcludeerd kan worden dat het doel van het project met name een economisch belang dient. De DEC realiseert zich ook dat de varkensprijzen onder druk staan en dat goed (duurder) voer economisch niet rendabel zal zijn en dat een suboptimale gezondheid niet altijd te vermijden is. In dat geval is het positief dat een additief nu voor verbetering kan zorgen. De DEC acht het mogelijk dat maatschappelijke groeperingen die zich tegen de bio-industrie keren, de ontwikkeling van dergelijke supplementen afwijzen omdat de huidige situatie in stand gehouden wordt. Vanuit dat oogpunt zou het project niet gedragen worden, ook al zal het welzijn van de proefdieren in het project niet ernstig geschaad worden. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

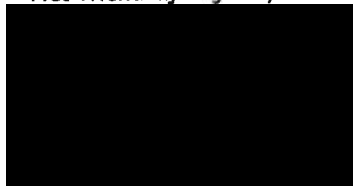
E. Advies

1. Advies aan de CCD:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Met vriendelijke groet,



[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 25 augustus 2015 16:30
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning dierproeven
Bijlagen: factuur 401002015123.pdf; ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven [REDACTED].pdf

Geachte heer/mevrouw,

Hierbij zenden wij u per mail een ontvangstbevestiging AVD/401002015123 "Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens".

De factuur wordt tevens gemaïld naar: [REDACTED]

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
[REDACTED]

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting DLO



Wageningen

**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
AVD401002015123

Geachte heer/mevrouw,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 6 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij hieraan hebben gegeven is AVD401002015123
Gebruik dit nummer als u contact met ons opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie 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 betalen, 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.

Bijlage:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100
Naam instelling of organisatie: Stg DLO
KvK-nummer: 9098104
Postbus: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] WAGENINGEN
IBAN: NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Postcode en plaats: [REDACTED]
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee
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 augustus 2015
Geplande einddatum: 1 augustus 2018
Titel project: Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens
Titel niet-technische samenvatting:

De invloed van hygiënestatus op de energie- en eiwitbehoefte van varkens

Naam DEC: DEC-DLO

Postadres DEC: [REDACTED] Wageningen

E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

Melding Machtiging

DEC-advies

Inkooporder [REDACTED]

Ondertekening

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Plaats: Wageningen

Datum: 6 augustus 2015

Stg DLO



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting DLO



Wageningen

**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
AVD401002015123

Datum 25-08-2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,
Op 6 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens met aanvraagnummer AVD401002015123. Uw aanvraag is helaas niet compleet. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Het originele aanvraagformulier

Leges

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

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hiervoor het formulier dat u bij deze brief krijgt. Wanneer wij de aanvullende informatie niet binnen de gestelde termijn hebben ontvangen, zullen wij uw aanvraag buiten behandeling stellen.

Wanneer een beslissing

Zodra uw aanvraag compleet is, krijgt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Melding Bijlagen



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen UR, Concernstaf+

[Redacted]
Wageningen

**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
AVD401002015123

Factuur

Factuurdatum 25 augustus 2015
Vervaldatum 24 september 2015
Factuurnummer [Redacted] / [Redacted]
Betreft Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

Omschrijving

Betaling leges projectvergunning dierproeven
Betreft aanvraag AVD401002015123

Bedrag

€ 741

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

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: donderdag 3 september 2015 13:57
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: stavaza Project AVD401002015123

Beste [REDACTED]
Zoals maandag telefonisch besproken zal uw aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering worden besproken. Dit zal binnen de wettelijke termijn van 40 dagen zijn.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.


Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 3 september 2015 13:35
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: stavaza Project AVD401002015123

Op 6 augustus jl is een aanvraag voor de projectvergunning Project AVD401002015123 gedaan. Kunt u aangeven wanneer wij de vergunning kunnen verwachten? Volgende mij is de behandeltijd van 20 dagen ruimschoots overschreven.
Bij voorbaat dank voor uw reactie.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
Wageningen Universiteit [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

T
F
E

 Please consider your environmental responsibility
before printing this e-mail.

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van het Facilitair Bedrijf, Veiligheid & Milieu is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 4 september 2015 9:34
Aan: [REDACTED]
CC: Info-zbo
Onderwerp: AVD401002015123 in behandeling genomen
Bijlagen: AVD401002015123_Acceptatiebrief.pdf

Beste [REDACTED]
Bijgevoegde brief wordt u ook per post toegezonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting DLO

████████████████████

██████████

██████████ Wageningen

**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
AVD401002015123

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
-

Datum 04 september 2015

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 06 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens" met aanvraagnummer AVD401002015123. Wij gaan uw aanvraag beoordelen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 01 oktober 2015 een beslissing. Omdat een DEC-advies is meegestuurd met de aanvraag, streven wij ernaar om de aanvraag binnen 20 werkdagen te beslissen.

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.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.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 7 september 2015 9:47
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: AVD401002015123

Beste [REDACTED]

Ik ben er vorige week niet aan toegekomen, heb er net naar gekeken. Advies is wel correct: project gaat over o.a. over aminozuren en andere toevoegingen/aanpassingen aan het voer en dus kan de term additieven ook in dit DEC-advies blijven staan.

Vr.gr. [REDACTED]

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: maandag 7 september 2015 9:36
To: [REDACTED]
Subject: RE: AVD401002015123

Beste [REDACTED]

Zou je me nog kunnen voorzien van een aangepast DEC-advies betreffende aanvraag AVD401002015123? (of de mededeling dat het aangeleverde DEC advies toch klopt?).

Als er nog vragen zijn dan hoor ik dit graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 1 september 2015 8:47
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: AVD401002015123

Beste [REDACTED]

Het gaat inderdaad om het project met als titel "Het ontwikkelen van voerstrategieën en additieven die de gezondheid van varkens ondersteunen", met het DEC advies van 22 juli 2015. In de correspondentie met de aanvrager kan inderdaad het nummer AVD246002015120 zijn gebruikt.

Het lijkt erop dat in het nieuwe project AVD401002015123, getiteld: "Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens" de ethische afweging uit het DEC-advies van 22 juli van "Het ontwikkelen van voerstrategieën en additieven die de gezondheid van varkens ondersteunen" is blijven staan.

Hopelijk is het niet duidelijk. Zo niet, laat het me maar even weten, dan bel ik je straks even.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Van: [redacted]

Verzonden: maandag 31 augustus 2015 16:16

Aan: 'Info-zbo'

Onderwerp: RE: AVD401002015123

Geachte mevrouw [redacted]

Het is mij niet duidelijk welk project nu precies bedoeld wordt. Het project AVD246002015132 is in de correspondentie met de aanvrager AVD246002015120. En heeft altitel Het ontwikkelen van voerstrategieën en additieven die de gezondheid van varkens ondersteunen. Het advies daarvan is gedateerd op 22 juli 2015. Kunt u aangeven of dit het project is dat u bedoelt?

Met vriendelijke groeten,

[redacted]

[redacted]
Lelystad
tel: [redacted]
fax: [redacted]
[redacted]

aanwezig: ma+di:8-16:30, wo+do: 8-12

[redacted]

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Sent: maandag 31 augustus 2015 13:19

To: [redacted]

Cc: Info-zbo

Subject: AVD401002015123

Beste [redacted]

Uw DEC heeft advies uitgebracht over een aanvraag met aanvraagnummer AVD401002015123, getiteld: "Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens", waarvoor onze dank.

Bij het lezen van uw advies, viel mij op dat de ethische afweging onder D, een directe copie is van de ethische afweging van aanvraag AVD246002015132, een ander project, ook door uw DEC beoordeeld. Ik begrijp dat een deel van de afweging van beide projecten overeenkomt, maar de beschrijving onder de ethische afweging gaat veel over additieven, wat niet overeen lijkt te komen met de aanvraag AVD401002015123.

Waarschijnlijk is hier wat mis gegaan. Kunt u dit toelichten en indien nodig een nieuw advies aan ons sturen? Het zou fijn zijn als dit deze week nog lukt. Kunt u me laten weten als dit niet lukt?

Met vriendelijke groet,



Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 8 september 2015 15:57
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvraag AVD401002015123

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

In onderstaande in blauw de antwoorden op de gisteren gestelde vragen over aanvraag AVD401002015123.

Het aantal dieren benodigd voor het experiment beschreven in bijlage 1 is mij niet helemaal duidelijk. De powerberekening die u heeft gedaan levert een groeps grootte van $n=5$. U wilt echter een groeps grootte van $n=6$ gaan gebruiken. De onderbouwing die u hiervoor geeft is dat in de uit te voeren studie het aantal dieren per experimentele eenheid bestaat uit 6 dieren i.p.v. de eerder gebruikte 9 dieren, en dat de duur van de meetperiode in de huidige studie korter is dan die in de voorgaande studie. Het is niet helemaal helder waarom een kleiner aantal dieren in een experimentele eenheid en een kortere meetperiode, het nodig maakt om meer experimentele eenheden te gebruiken. Kunt u dit onderbouwen?

De powerberekening is uitgevoerd op basis van variatie geschat in een setting met 9 varkens per hok (=experimentele eenheid). In de meetopstelling beschreven in de aanvraag kunnen we maximaal 6 varkens huisvesten (is ook nodig voor het betrouwbaar meten van metabolisme in deze faciliteiten). We hebben in deze opstelling wel ervaring met 5 dieren/hok. Uit ervaring weten we dat variatie toeneemt met een afnemend aantal dieren in een experimentele eenheid. Daarnaast neemt de betrouwbaarheid van de schatting van groei een beetje toe met de lengte van de meetperiode. Op grond van deze schattingen hebben we het benodigd aantal experimentele eenheden van 5 naar 6 bijgesteld.

In bijlage 2 onder vraag E heeft u geschreven: "Deze dierproef is voor zover bekend eerder uitgevoerd". Wij gaan ervan uit dat dit een typ-fout is en dat u hiermee bedoelt dat deze niet eerder is uitgevoerd. Dit is inderdaad een typfout en hier moet staan: Deze proef is voor zover bekend niet eerder uitgevoerd.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Wageningen
T: [REDACTED]
e-mail [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: maandag 7 september 2015 11:58
Aan: [REDACTED]
CC: Vergunningenloket
Onderwerp: Aanvraag AVD401002015123

Beste Heer [REDACTED]
Ik ben bezig met de behandeling van uw aanvraag AVD401002015123, en heb hier nog een vraag over.

Kunt u mij uiterlijk vrijdag 11 september van een antwoord voorzien?

Het aantal dieren benodigd voor het experiment beschreven in bijlage 1 is mij niet helemaal duidelijk. De powerberekening die u heeft gedaan levert een groeps grootte van $n=5$. U wilt echter een groeps grootte van $n=6$ gaan gebruiken. De onderbouwing die u hiervoor geeft is dat in de uit te voeren studie het aantal dieren per experimentele eenheid bestaat uit 6 dieren i.p.v. de eerder gebruikte 9 dieren, en dat de duur van de meetperiode in de huidige studie korter is dan die in de voorgaande studie. Het is niet helemaal helder waarom een kleiner aantal dieren in een experimentele eenheid en een kortere meetperiode, het nodig maakt om meer experimentele eenheden te gebruiken. Kunt u dit onderbouwen?

In bijlage 2 onder vraag E heeft u geschreven: "Deze dierproef is voor zover bekend eerder uitgevoerd". Wij gaan ervan uit dat dit een typ-fout is en dat u hiermee bedoelt dat deze niet eerder is uitgevoerd.

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.

U heeft 14 dagen de tijd om deze vraag te beantwoorden. Om er zeker van te zijn dat deze aanvraag in de volgende CCD vergadering zal worden behandeld wil ik u vragen om mij z.s.m. maar uiterlijk vrijdag 11 september van een antwoord te voorzien.

Met vriendelijke groet,



Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: dinsdag 15 september 2015 14:41
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: RE: t.a.v. [Redacted]

Categorieën: Dossier: [Redacted]

Beste Mevrouw [Redacted]
Ik zal in gang zetten dat het dubbel betaalde bedrag zal worden teruggestort.
Bedankt voor het uitzoeken.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Van: [Redacted]
Verzonden: dinsdag 15 september 2015 13:50
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: t.a.v. [Redacted]

Hallo [Redacted]

Dit is een overzicht van alle goedgekeurde facturen, deels al met betaaldatum. De facturen [Redacted], [Redacted], [Redacted] en [Redacted] kunnen na 2-9-2015 betaald zijn of worden deze week betaald.
De facturen [Redacted] en [Redacted] zijn per abuis met een termijn van 30 dagen ingevoerd. Dit heb ik aangepast naar 8 dagen, die facturen worden nu volgende week betaald.

Factuurnr.	Crediteur(T)	Jaar	Bedrag	Fact.datum	Vervaldatum	Betaald
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

201570123	CENTRALE COMMISSIE DIERPROEVEN	2015	-741	25-8-2015	2-9-2015	2-9
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

Factuur 201570123 is kennelijk zowel door Wageningen UR [REDACTED] als door St.DLO [REDACTED] ingevoerd en betaald. De factuur had alleen door Wageningen UR [REDACTED] betaald moeten worden. Kan die factuur aan St.DLO [REDACTED] worden gecrediteerd en teruggestort? In verband hiermee stuur ik deze mail ook naar mijn collega [REDACTED]

Met vriendelijke groeten

[REDACTED]
 Wageningen UR Concernstaf+
 [REDACTED]
 T [REDACTED]
 E [REDACTED]
www.wageningenur.nl

Bezoek-, post- en factuuradres:
 Wageningen UR Concernstaf+
 t.a.v. [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED] Wageningen
 E [REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 14 september 2015 16:27
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: FW: Factuur dubbel betaald.

Hoi [REDACTED]

Afgelopen vrijdag heeft [REDACTED] een overleg gehad met het hoofd van de CCD, de heer Peuter, waarbij diverse knelpunten zijn besproken. Door de CCD is gemeld dat een factuur mogelijk 2x betaald is of dat een van deze bedragen bedoeld is voor aanvraag [REDACTED]. Het factuurnummer voor aanvraag [REDACTED] (factuur [REDACTED]) staat namelijk nog open. Kun een van jullie nagaan wat hier mis is gegaan en dit willen kortsluiten met de CCD (info@zbo-ccd.nl t.a.v. [REDACTED]).

Met vriendelijke groet,
 [REDACTED]

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: maandag 14 september 2015 14:10
Aan: Vergunningenloket
CC: Secretariaat OBDA
Onderwerp: Factuur dubbel betaald.

Beste [REDACTED]

Nogmaals bedankt voor je bezoek aan ons afgelopen vrijdag en de open communicatie. Wij kregen van onze financiële administratie te horen dat:

Op 02/09 is van Universiteit Wageningen met factuurnummer 201570123 en met banknr [REDACTED] € 741 ontvangen en op 04/09 is van St.DLO [REDACTED] met factuurnummer 201570123 en met banknr [REDACTED] € 741 ontvangen.

Is dit inderdaad een dubbele betaling van aanvraag AVD401002015123 of kan het zijn dat een van deze bedragen bedoeld is voor aanvraag [REDACTED]?. Ik hoor het graag, zodat we indien nodig het teveel betaalde bedrag kunnen terugstorten.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 17 september 2015 9:05
Aan: 'Info-zbo'; [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: t.a.v. [REDACTED]

Beste Mevrouw [REDACTED]
 Als het goed is, is het teveel betaalde bedrag onderweg naar DLO. Laat ons a.u.b. weten als het bedrag niet bij u binnenkomt, dan ga ik hier weer achteraan.

Met vriendelijke groet,
 [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: dinsdag 15 september 2015 14:41
Aan: [REDACTED]; Info-zbo (info@zbo-ccd.nl)
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: t.a.v. [REDACTED]

Beste Mevrouw [REDACTED]
 Ik zal in gang zetten dat het dubbel betaalde bedrag zal worden teruggestort.
 Bedankt voor het uitzoeken.

Met vriendelijke groet,
 [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 15 september 2015 13:50
Aan: Info-zbo (info@zbo-ccd.nl)
CC: [REDACTED]
Onderwerp: t.a.v. [REDACTED]

Hallo [REDACTED]

Dit is een overzicht van alle goedgekeurde facturen, deels al met betaaldatum. De facturen [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] en [REDACTED] kunnen na 2-9-2015 betaald zijn of worden deze week betaald.

De facturen [REDACTED] en [REDACTED] zijn per abuis met een termijn van 30 dagen ingevoerd. Dit heb ik aangepast naar 8 dagen, die facturen worden nu volgende week betaald.

Factuurnr.	Crediteur(T)	Jaar	Bedrag	Fact.datum	Vervaldatum	Betaald
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

Kun een van jullie nagaan wat hier mis is gegaan en dit willen kortsluiten met de CCD (info@zbo-ccd.nl) t.a.v. [REDACTED].

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Verzonden: maandag 14 september 2015 14:10

Aan: Vergunningenloket

CC: Secretariaat OBDA

Onderwerp: Factuur dubbel betaald.

Beste [REDACTED]

Nogmaals bedankt voor je bezoek aan ons afgelopen vrijdag en de open communicatie. Wij kregen van onze financiële administratie te horen dat:

Op 02/09 is van Universiteit Wageningen met factuurnummer 201570123 en met banknr [REDACTED] € 741 ontvangen en op 04/09 is van St.DLO [REDACTED] met factuurnummer 201570123 en met banknr [REDACTED] € 741 ontvangen.

Is dit inderdaad een dubbele betaling van aanvraag AVD401002015123 of kan het zijn dat een van deze bedragen bedoeld is voor aanvraag [REDACTED]. Ik hoor het graag, zodat we indien nodig het teveel betaalde bedrag kunnen terugstorten.

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 21 september 2015 17:07
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Besluit AVD401002015123
Bijlagen: AVD401002015123_Beslissing.pdf

Beste meneer/mevrouw,

Bijgevoegde brief is u vandaag ook per post toegezonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted] WAGENINGEN



**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
AVD401002015123

21 SEP. 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Op 6 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens" met aanvraagnummer AVD401002015123. 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. U kunt met uw project "Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens" starten. De vergunning wordt afgegeven van 21 september 2015 tot en met 1 augustus 2018.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-DLO gevoegd. Dit advies is opgesteld op 5 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- 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:


ir. G. de Peuter
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: Stg DLO

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED] WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 21 september 2015 tot en met 1 augustus 2018, voor het project "Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens" met aanvraagnummer AVD401002015123, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-DLO.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Senior onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 6 augustus 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 augustus 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 augustus 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 5 augustus 2015, ontvangen op 6 augustus 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Experiment met vleesvarkens in klimaatrespiratiecellen	Varkens (Sus scrofa domesticus) / varken	180	Matig / moderate	
Validatie experiment op een vleesvarken praktijkbedrijf	Varkens (Sus scrofa domesticus) / varken	700	Matig / moderate	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele 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.



Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte heer, mevrouw,

Onderstaand het advies van de DEC aangaande het project:

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002015123**
2. Titel van het project: **Immuuncompetentie en gezondheidsstatus: consequenties voor nutriëntenbehoefte bij vleesvarkens**
3. Titel van de NTS: **De invloed van hygiënestatus op de energie- en eiwitbehoefte van varkens**
4. Type aanvraag: **nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
DEC-DLO
[redacted]
Secretaris: [redacted]
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 14-06-2015
Aanvraag compleet: 14-06-2015
In vergadering besproken: 01-07-2015
8. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 06-07-2015
Strekking van de vragen:
 - De DEC heeft geadviseerd om het project na te lopen op taal en spelling
 - De DEC heeft vragen gesteld over:
 - De herkomst van de mest en het risico op ziekte-insleep
 - De bruikbaarheid van de Novel Object Test (NOT)
 - De leeftijd van de dieren: zijn er minder dieren nodig wanneer gebruik gemaakt wordt van zwaardere dieren
 - Vergelijkbaarheid en verband tussen beide proeven, met name voor wat betreft de gebruikte stress-test
 - Rechtvaardigt het aantal in te zetten reservedieren de uitval en wat gebeurt er met de reservedieren die niet in de experimenten ingezet worden

Dierexperimenten
Commissie WUR

DATUM
5 augustus 2015

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002015123

LW KENMERK
AVD 401002015123

POSTADRES
Postbus 65
8200 AB Lelystad

BEZOEKADRES
[redacted]

INTERNET
www.wageningenUR.nl

KVK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[redacted]

TELEFOON
[redacted]

E-MAIL
[redacted]

- o Reden waarom gekozen wordt voor een experiment onder praktijkomstandigheden (waarbij niet voldaan wordt aan de Wod-eisen voor wat betreft dierruimte)

Datum antwoorden: 16-07-2015, 24-07-2015 en 29-07-2015

De strekking van de antwoorden is:

- o Dat er inderdaad door de mest kans op ziekte insleep is (bijvoorbeeld een worminfectie), maar dat dit onderdeel is van het onderzoeksmodel.
- o Dat er over de NOT van tevoren contact zal worden opgenomen met een gedragsdeskundige en dat t.z.t. in het proefplan de wijze van uitvoer van de NOT zal worden aangegeven.
- o Dat minder dieren niet gewenst zijn omdat een lagere hokbezetting dan zal afwijken ten opzichte van de situatie op praktijkbedrijven.
- o Dat in de eerste dierproef vanwege de proefomstandigheden (respiratiekamers) geen human approach test (HAT) uitgevoerd kan worden en een Novel Object Test uitgevoerd (NOT) zal moeten worden.
- o Dat reservedieren nodig zijn omdat het van het grootste belang is dat het onderzoek wordt uitgevoerd met klinisch niet afwijkende en voldoende homogene groepen, en dat de reservedieren die niet Ingezet worden in de experimenten verder volgens bestaande routine opgefokt en later afgeleverd zullen worden naar een slachthuis.
- o Dat het verschil tussen de eerste en de tweede dierproef juist het verschil tussen experimentele en praktijkomstandigheden is en dat daarom de hokbezetting afwijkt ten opzichte van de eisen van de Wod.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag angekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. Het reële belang van het project, te weten het in kaart brengen van de voedingsbehoefte van gezonde maar wel (immunologisch) belaste varkens zodat de voeding beter afgestemd kan worden op de behoefte, wordt door de DEC onderschreven.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: De dieren in dierproeftype 2 worden gehouden buiten een proefdierinstelling, bij een commerciële praktijkstal waarbij niet voldaan wordt aan de huisvestingseisen zoals die door de Wod zijn gesteld. De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "moderate" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit bloedafname, LPS-test, stress-test en hantering.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Vanwege bruikbaarheid in de praktijk is het project niet anders dan in het doeldier uit te voeren.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Door statistische analyse wordt het aantal proefdieren tot een minimum beperkt. De aanvrager beschikt door literatuuronderzoek over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC erkent dat niet op alle punten voldaan kan worden aan de eisen die de Europese Richtlijn voorschrijft en volgt hierin de argumenten die de onderzoeker in het projectplan onder F aangeeft. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
11. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

DATUM
5 augustus 2015

PAGINA
3 van 4

D. Ethische afweging

- De DEC is unaniem van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. De DEC is van mening dat dit project een oplossing kan bieden voor de korte termijn, maar dat het op lange termijn geen oplossing biedt. Met het gebruik van dergelijke supplementen wordt kwalitatief minder goed voer en suboptimaal zoötechnisch management (leidend tot subklinische gezondheidsaantasting) gecompenseerd, waardoor de huidige situatie met een lagere kwaliteit aan management en basisvoer in stand blijft. Wanneer de kwaliteit van het normale voer en het management hoger zou zijn dan zou er in de ogen van de DEC geen behoefte zijn aan een dergelijk additief. Enerzijds kan gesteld worden dat de massale bio-industrie moeilijk te vervangen is en dat additieven dan een middel zijn om de huidige situatie te verbeteren, maar anderzijds zijn er ook veel mensen die de grootschalige productie wil verminderen. Een grote groep in de maatschappij wil echter niet meer betalen voor duurzamer vlees en verschaft zich de legitimiteit om daar dieren voor op te offeren. Mondiaal gezien exporteert Nederland veel vlees dus ook economische belangen spelen een rol in de ethische afweging. De vraag rijst of men in Nederland de massaproductie in stand moet houden voor het buitenland terwijl in die landen het platteland leeg loopt.

Geconcludeerd kan worden dat het doel van het project met name een economisch belang dient. De DEC realiseert zich ook dat de varkensprijzen onder druk staan en dat goed (duurder) voer economisch niet rendabel zal zijn en dat een suboptimale gezondheid niet altijd te vermijden is. In dat geval is het positief dat een additief nu voor verbetering kan zorgen. De DEC acht het mogelijk dat maatschappelijke groeperingen die zich tegen de bio-industrie keren, de ontwikkeling van dergelijke supplementen afwijzen omdat de huidige situatie in stand gehouden wordt. Vanuit dat oogpunt zou het project niet gedragen worden, ook al zal het welzijn van de proefdieren in het project niet ernstig geschaad worden. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Met vriendelijke groet,



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.

Locatie

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 8 oktober 2015 9:47
Aan: [REDACTED]
CC: Info-zbo
Onderwerp: Terugkoppeling AVD401002015123

Beste DEC,

Enige tijd geleden heeft u de CCD van een advies voorzien betreffende aanvraag AVD401002015123. Onze dank voor uw heldere advies, waarin u goed heeft weergegeven wat uw overwegingen waren. Er is uw DEC nog om opheldering gevraagd over de ethische afweging. Deze leek gecopieerd van een andere aanvraag en mogelijk incorrect. De DEC heeft echter aangegeven dat deze afweging wel bij deze aanvraag hoorde.

De CCD heeft de onderzoeker nog om verheldering gevraagd van het aantal dieren te gebruiken in bijlage 1. De powerberekening die werd beschreven leverde een groeps grootte van $n=5$, terwijl een groeps grootte van $n=6$ zou worden gebruikt. De CCD heeft gevraagd om een iets helderdere onderbouwing hiervoor.

Het advies van de DEC is gevolgd, het project is vergund. Wel met de algemene voorwaarden:

- 1) Go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.
- 2) 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.

Deze e-mail is enkel ter informatie.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl 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	3 0 2 7 5 9 2 4
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	[REDACTED]
		Postbus	[REDACTED]
		Postcode en plaats	[REDACTED] 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	Universitair Docent
		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	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 7 _ 2 0 1 5 |
| Einddatum | 0 1 _ 0 7 _ 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Een in vitro endometrium model voor toxicologisch onderzoek
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Een in vitro endometrium model voor toxicologisch onderzoek
- 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 € 741,00 Lege
 Wijziging € 468,00 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
- Beschrijving dierproef

6 Ondertekening


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

Naam 

Functie 

Plaats 

Datum 5 - 06 - 2015

Handtekening 



Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres

postadres

uw kenmerk
ons kenmerk

datum 5 juni 2015
onderwerp Aanvraag projectvergunning

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u een projectvergunningaanvraag.

Correspondentieadres

Ik verzoek u vriendelijk de correspondentie aan portefeuillehouder te verzenden aan [REDACTED]. Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v. [REDACTED].

Facturering

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

Factuuradres

Ik verzoek u vriendelijk de factuur digitaal in te dienen. Via die route kunnen de leges het snelst worden voldaan. Hiervoor kunt u gebruik maken van het volgende e-mail adres:

Het ondertekende aanvraagformulier is u per separate post toegezonden op 5 juni 2015.



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- 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.

In dit project wordt een in vitro endometrium model opgezet I) waarmee endometriale effecten zoals die in vivo worden gevonden beter mechanistisch onderzocht kunnen worden II) wat gebruikt kan worden bij toekomstige toxicologische risicobeoordeling van hormoonverstorende stoffen. Ziektes van de baarmoeder, zoals baarmoederkanker of endometriose, is een relatief veel voorkomende ziekte bij vrouwen in de Westerse wereld. Met 5% van de nieuwe kankergevallen bij vrouwen per jaar is endometrium kanker is de vierde meest voorkomende kanker bij vrouwen in Europa [GLOBO2015]. Endometriose treft zo'n 5-10% van de vrouwen in de vruchtbare leeftijd [Bulletini2010]. De oorzaak van deze endometrium ziektes zijn echter nog niet altijd opgehelderd, maar het is algemeen geaccepteerd dat (verstoring van) de hormoonhuishouding een belangrijke rol speelt in het ontstaan van deze aandoeningen. Dagelijks worden mensen blootgesteld aan stoffen die de hormoonhuishouding kunnen verstoren, bijvoorbeeld via voedsel. Om de gezondheid van vrouwen te kunnen beschermen is het dus belangrijk om te kunnen onderzoeken of en hoe deze stoffen de normale werking van het endometrium kunnen beïnvloeden. Zo'n toxicologische risicobeoordeling van (hormoonverstorende) stoffen wordt tot nu toe voornamelijk gedaan met in vivo studies bij ratten naar bijvoorbeeld reproductie of carcinogene effecten. Daarbij worden regelmatig endometriale tumoren, endometriale hyperplasie en endometriose gevonden. Om goed te kunnen onderzoeken hoe deze endometriale effecten ontstaan, wordt in dit project een in vitro endometrium model opgezet met rattencellen. Hierin kan beter gekeken worden naar cel-cel communicatie en responsen van endometriumcellen als gevolg van (in vitro) blootstelling aan hormonen en lichaamsvreemde, hormoonverstorende stoffen. Omdat het vanuit de literatuur onduidelijk is hoe groot de invloed van endogene hormonen is op de respons in endometriale cellen [Arslan1995; Piva1996; Groothuis2007], zal in een pilot studie eerst het effect van ovariectomie voorafgaand aan de endometrium isolatie worden onderzocht. Daartoe zullen endometriale cellen worden geïsoleerd van ratten die ovariectomie hebben ondergaan en ratten waarbij dat niet is uitgevoerd. Veranderingen in biomarkers (zoals expressie van hormoonreceptoren en afgifte van hormonen en chemokines) na in vitro blootstelling aan hormonen zullen worden bepaald in de celkweken afkomstig van endometria met/zonder ovariectomie en worden beoordeeld op fysiologische relevantie. Nadat normale hormoonresponsen zijn vastgesteld, zal worden besloten of ovariectomie noodzakelijk is voor het in vitro model. Hierna wordt de methode vastgesteld en kan het in vitro endometriummodel gebruikt worden voor het testen van verstorende effecten van lichaamsvreemde stoffen. De uitkomsten van het vitro endometriummodel kunnen vervolgens voor bekende hormoonverstorende stoffen worden vergeleken met bestaande in vivo data(bases) waarin endometriale effecten bij ratten worden beschreven, zoals bijvoorbeeld voor dioxine-achtige stoffen [Walker2006; Yoshizawa2009]. Indien het in vitro endometrium model voldoende voorspellend lijkt te zijn voor in vivo effecten, zal het gebruikt worden voor het testen van hormoonverstorende stoffen waarvan de endometriale effecten nog niet bekend zijn.

Om in de toekomst voor onbekende stoffen het risico op endometriale effecten te kunnen voorspellen zijn modellen nodig, welke bij voorkeur in vitro zijn met het oog op de ethische noodzaak tot vermindering van het aantal proefdieren en huidige kosten voor toxicologisch onderzoek onder de Europese wetgeving. Het IRAS werkt op internationaal niveau aan het ontwikkelen, valideren en implementeren van alternatieve testmethodes in toxicologische risicobeoordeling. Het inzetten van in vitro modellen bespaart niet alleen proefdieren, maar heeft ook mechanistisch, wetenschappelijk veel meerwaarde. Hormoonlevels kunnen in vitro makkelijker gecontroleerd en gemoduleerd worden, waardoor hormoonverstorende effecten met grotere zekerheid kunnen worden vastgesteld dan op

basis van in vivo studies. Een probleem is echter dat huidige (toxicologische) risicobeoordeling van chemische stoffen tot nu toe nog voornamelijk gedaan wordt met in vivo studies bij ratten en/of muizen, ondanks dat de vertaalbaarheid hiervan naar de humane situatie niet altijd duidelijk is. Bij deze studies worden regelmatig endometriale effecten van hormoonversturende stoffen gevonden. Echter, gezien de verschillen in hormoonhuishouding tussen rat en mens is het maar de vraag wat de humane relevantie is van de endometriale effecten bij ratten. Dit is tot nu toe nog niet goed onderzocht. Om deze vraag goed te kunnen onderzoeken en mechanistisch te kunnen beantwoorden wordt binnen dit project ook een in vitro endometrium model opgezet met humane cellen volgens de methode van Chen et al. [Chen2013]. Data uit het ratten endometriummodel kunnen vergeleken worden met bestaande vivo data(bases), data van het humane celmodel kan voor bekende stoffen (zoals dioxines) met epidemiologische data vergeleken worden. Op deze manier kunnen de effecten die in vivo bij ratten gevonden worden mechanistisch beter onderzocht worden en levert het informatie op mbt de vertaalbaarheid naar de humane situatie. De resultaten uit het ratten en humane endometriummodel zullen ook worden vergeleken vwb voorspelbaarheid/toepasbaarheid, haalbaarheid (verkrijgen van weefsel) en reproduceerbaarheid. Het meest geschikte model kan in de toekomst worden gebruikt om een toxicologische risicoschatting te maken voor endometriale effecten van lichaamsvreemde stoffen. In dit project willen we zo een uitspraak doen over toepasbaarheid en voorspelbaarheid van het ratten en humane in vitro endometriummodel. De verwachting is dat het humane model prevaleert boven het ratten model, zodat deze toegepast kan worden voor testen van stoffen en er geen verdere studies met rattenendometrium meer nodig zijn. De kennis uit dit project zal verder bijdragen aan het voorkomen van endometriale effecten bij mensen als gevolg van blootstelling aan hormoonversturende stoffen en het verminderen van proefdieren in toxicologische risicobeoordeling. NB voor het gebruik van humane primaire cellen wordt bij de Medisch Ethische Toetsingscommissie toestemming gevraagd.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van het project is om een in vitro endometrium model te maken waarin de hormonale effecten van lichaamsvreemde stoffen getest kunnen worden. Daartoe zullen in vitro modellen gemaakt en getest worden met primaire humane en ratten endometrium cellen. Het ratten-model is nodig om de voorspellende waarde en toepassing van het model te valideren aan de hand van bestaande in vivo data(bases) van bekende stoffen. Binnen dit project zal ook een in vitro endometrium model opgezet worden met humane endometrium cellen. Na vergelijking en validatie van deze twee modellen kan het meest geschikte in vitro endometrium model gebruikt worden voor het onderzoeken van endometriale effecten van (chemische) stoffen en medicijnen. Dit is nodig voor het efficiënt testen van mogelijk toxische stoffen, zonder onnodig gebruik van proefdieren. Het IRAS heeft ruime ervaring met in vitro modellen, isoleren en kweken van primaire cellen (waaronder ratten endometrium cellen) en toxicologische risicobeoordeling. Het project bevat enkele beslismomenten en mijlpalen, waardoor het opzetten van een in vitro endometrium model, zoals beoogd in dit voorstel, haalbaar is binnen de gestelde tijd.

3.3 Belang

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

Door het ontwikkelen en uitvoeren van dit in vitro model kan meer kennis verkregen worden mbt de normale werking van het endometrium, alsmede de effecten van lichaamsvreemde stoffen op deze werking. Een in vitro endometrium model kan ingezet worden bij de toxicologische risicobeoordeling van lichaamsvreemde stoffen, zoals chemische en/of plantstoffen, hormoonachtige stoffen en medicijnen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Voor het opzetten van een in vitro co-cultuur endometrium model zijn epitheliale en stromale endometriumcellen nodig van jong volwassen vrouwelijke Sprague-Dawley ratten (~P35). De keuze voor Sprague Dawley is gebaseerd op in vivo studies waarin bij deze rattensoort kanker aan de uterus ontstaat na blootstelling aan de natuurlijke plantenstof indole-3-carbinol [NTP2014] en dioxines [Yoshizawa2009].

Na acclimatiseren, worden de ovaria verwijderd om endogene, ovariële hormoon productie te stoppen. Dit wordt gedaan omdat de endometrium cellen in vitro zullen worden gebruikt voor het onderzoeken van hormonale effecten. Daarbij is het noodzakelijk dat de cellen geen invloed van endogene hormonen ondervinden en in verschillende stadia van hormonale gevoeligheid verkeren. Het synchroniseren van de cyclus kan dit waarschijnlijk slechts gedeeltelijk bereiken: op basis van vaginale cytologie kan de cyclus status met redelijke zekerheid bepaald worden, maar vaginale cytologie komt niet goed overeen met hormoon gehalten in bloed [Singletary2005]. Daarnaast is chemische synchronisatie, bv door injectie van hormonen, ongewenst ivm de toxicologische toepassing. Het synchroniseren van estrous cycle dmv plaatsen van een mannetjes dier (Whitten effect) lijkt bij vrouwelijke ratten die samen gehuisvest zijn niet/minder sterk op te treden, in tegenstelling tot bij muizen [Sharpe1998; Schank2004]. Daarnaast leidt synchronisatie van de estrous cyclus alsnog niet tot afwezigheid van lokale, ovariële productie van hormonen, waardoor nog steeds grote variatie in celstatus op kan treden.

Tien dagen na ovariectomie, worden de dieren geëuthanaseerd en de uteri verwijderd. Cellen worden geïsoleerd en gescheiden door enzymatische bewerking en centrifugatie zoals beschreven door [Piva1996]. Bij de eerste sectie zal onderzocht worden in hoeverre ovariectomie effect heeft op de hormonale gevoeligheid van de endometriumcellen in het beoogd in vitro endometrium model. Hiertoe zullen endometriale cellen geïsoleerd worden van 6 dieren mét ovariectomie en 6 dieren zonder ovariectomie waarbij estrous status wordt vastgesteld dmv vaginale cytologie (voor onderbouwing aantallen zie Bijlage Beschrijving Dierproef).

De cellen zullen vervolgens gebruikt worden voor het optimaliseren van celislatie methode, in vitro kweekopzet en vaststellen van meetbare biomarkers dmv genexpressie, hormoon- en chemokine bepaling. Tevens zal in deze eerste isolatie de invloed van vrouwelijke geslachtshormonen (i.e. estradiol en progesteron) op deze biomarkers onderzocht worden.

Na de eerste sectie zal worden besloten of ovariectomie noodzakelijk is of dat vaginale cytologie volstaat. Op basis hiervan wordt het protocol vastgesteld voor de behandeling van de dieren en de in vitro methode inclusief de eindparameters. Deze vastgestelde methode zal vervolgens gebruikt worden bij volgende proeven. Deze zullen waarschijnlijk bestaan uit secties van 15 dieren, al hangt dit af van de celopbrengst per uterus (zie ook Bijlage Beschrijving Dierproef, punt 2A).

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

Opzetten van in vitro endometrium model (pilot): ovariectomie, euthanasie en hysterectomie rat.

Testen van hormoonverstorende stoffen met bekende endometriale effecten (validatie): (mogelijk ovariectomie) euthanasie en hysterectomie rat.

Testen van hormoonverstorende stoffen met onbekende, maar verwachte endometriale effecten: (mogelijk ovariectomie) euthanasie en hysterectomie rat.

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.

Er zullen per keer zo'n 12-15 ratten gebruikt worden voor isolatie van endometrium. De resultaten van de eerste sectie zullen gebruikt worden voor (verder) optimaliseren van cel isolatie, kweek- en meetmethodes. In deze sectie wordt ook de noodzaak van ovariectomie onderzocht. Ratten uit volgende secties worden ingezet voor testen van endometriale effecten van lichaamsvreemde, hormoonverstorende stoffen. Eerst zullen stoffen getest worden waarvan bekend is dat ze endometriale effecten in vivo veroorzaken, zoals dioxines en I3C. Als het model goed werkt zullen er meer stoffen, waarvan de werking nog niet geheel duidelijk is, worden getest.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Ovariectomie en, na euthanasie, hysterectomie rat
2	
3	
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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 3.4.4.1 | Ovariectomie en, na euthanasie, hysterectomie rat |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In de studie wordt een in vitro endometrium model opgezet. Hiertoe isoleren we endometriale (epitheliale en stromale) cellen uit uteri van (jong) volwassen vrouwtjes ratten. Endometriumcellen zullen na isolatie in vitro gekweekt en blootgesteld worden aan hormonen en teststoffen. Mogelijk leveren endogene hormonen te veel variatie in celstatus en responsiviteit om de effecten van hormoonverstorende stoffen te kunnen testen in vitro. De literatuur is hierover niet eenduidig [Arslan1995; Piva1996; Groothuis2007]. Daarom zal in de eerste sectie bepaald worden of het noodzakelijk is een ovariectomie (volgens [Piva1996]) uit te voeren, 10 dagen voor euthanasie en hysterectomie. Indien de cellen vergelijkbare responsen (vwb hormoon- en chemokine secretie, genexpressie) laten zien, zal ervoor gekozen worden in volgende secties geen ovariectomie uit te voeren maar alleen een bepaling van estrous status dmv

vaginale cytologie. Het lichaamsgewicht van de ratten wordt gemonitord.

Na in vitro blootstelling worden verschillende parameters bepaald, waaronder hormoon- en chemokine secretie, genexpressie en aromatase activiteit.

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.

Na acclimatiseren wordt een ovariectomie uitgevoerd. Dit gebeurt onder algehele narcose. Naar schatting duurt dit ongeveer 0.5 uur per rat. Na 10 dagen zullen de dieren worden geëuthanaseerd.

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

Uit eerdere experimenten in ons lab blijkt dat er minimaal $10\text{-}15 \times 10^6$ stromale en epitheliale cellen geïsoleerd kunnen worden uit 6 uteri [Ede2010]. De schatting van 225 dieren is gebaseerd op het aantal cellen wat nodig is voor het opzetten (optimaliseren) van het in vitro model en het testen van stoffen. Hierbij is uitgegaan van 12-15 dieren per sectie, wat ongeveer twee 12-wells platen aan endometrium cellen oplevert. Het exacte aantal dieren en cellen zal worden vastgesteld na de eerste sectie tbv optimalisatie. In twee 12-wells platen kunnen 8 blootstellingen in triplo worden uitgevoerd, wat betekent dat per sectie een negatieve (vehicle) en positieve (alleen hormonen) controle en twee stoffen in 3 concentraties in triplo getest kunnen worden. Tervergelijking: in vivo zou 15 dieren maximaal voldoende zijn voor 3 experimentele groepen (bv 1 controle en 2 doses van een teststof).

In de eerste sectie van 15 dieren (pilot) zal het effect van ovariectomie en in vitro blootstelling aan hormonen op endometriale biomarkers worden onderzocht [vanEde2010; Chen2013]. Op basis van deze uitkomsten wordt besloten of het noodzakelijk is voorafgaand aan een volgende sectie een ovariectomie uit te voeren. Na vaststellen van het optimale protocol/methode zullen effecten van lichaamsvreemde, hormoonverstorende stoffen getest worden in het in vitro endometriummodel, waaronder dioxines (bv tetrachloro-p-dibenzodioxine; TCDD), natuurlijke plantenstoffen die vergelijkbaar werkingsmechanisme lijken te hebben (bv indole-3-carbinol; I3C) en andere hormoonverstorende stoffen. De keuze van de stoffen is gebaseerd op eerder gevonden endometriale effecten in vivo [NTP2014] en toxicologische relevantie bij mensen [Simsa2010]. In totaal verwachten we op basis van bovengenoemde getallen, 6-8 secties uit te voeren, waarbij we 1 sectie ter optimalisatie (pilot) gebruiken en 5-7 secties uit voeren voor het testen van hormoonverstorende stoffen, waarvan we weten dat ze in vivo endometriale effecten veroorzaken. Als blijkt dat het in vitro model goed werkt, zullen ook stoffen worden getest in het in vitro model waarvan we nog niet goed de endometriale effecten weten. In dat geval zullen we nog eens 5-7 secties uit voeren. In totaal verwachten we dus 11-15 secties uit te voeren met 12-15 dieren per sectie. Dit levert een totaal beoogd aantal ratten op van 180-225.

B. De dieren

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

225 Harlan Sprague Dawley ratten, jong volwassen vrouwtjes (~P35) voor het verkrijgen van voldoende endometriale cellen tbv in vitro testen van hormoonverstorende stoffen.

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.

De uteri van de vrouwtjes ratten worden gebruikt voor het opzetten en toepassen van een in vitro endometrium model. Parallel zal ook een in vitro endometrium model met humane endometrium cellen gebruikt worden. Op basis van de uitkomsten van dit project zal een model gekozen worden wat voor toekomstig toxicologisch onderzoek gebruikt kan worden. Het is aannemelijk dat het meest humaan relevante endometriummodel zal bestaan uit het in vitro endometrium model met primaire humane cellen. Humaan gezondheidsschadelijke effecten kunnen dan in de toekomst onderzocht worden in dit in vitro model in plaats van in een in vivo ratten model (vervanging). Door het in vitro opkweken van de endometrium cellen kunnen meerdere doseringen en stoffen getest worden met (uteri van) 1 rat (vermindering). Daarnaast is de opbrengst in aantal cellen bij een rat hoger dan bij muizen, waardoor er minder dieren (aantallen) nodig zijn (vermindering). De keuze voor Sprague-Dawley ratten is gebaseerd op het feit dat veel toxicologische testen worden uitgevoerd met deze dier(soort) [bv NTP2014]. Daarnaast worden de dieren niet in vivo blootgesteld (verfijning). Tevens onderzoeken we eerst of ovariectomie daadwerkelijk noodzakelijk is voor het in vitro gebruik van endometriale cellen, of dat er een andere mogelijkheid is om effecten van endogene hormonen te vermijden (verfijning).

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

De dieren zullen in groepen worden gehuisvest met beschikking tot kooiverrijking. Ovariectomie gebeurt onder volledige narcose volgens GDL protocol. Hierbij worden twee kleine incisies gemaakt. Dit heeft de voorkeur boven 1 incisie in via de linea alba, aangezien dat een grotere incisie is wat meer risico op infectie oplevert en meer belasting van de buikorganen.

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.

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Experimentele handeling (ovariectomie, euthanasie)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

ongerief na chirurgische ingreep (ovariectomie)

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

Ovariectomie wordt onder algehele narcose uitgevoerd. Nazorg en controle zal worden uitgevoerd om eventueel ongerief te signaleren en doeltreffend te kunnen behandelen. Euthanasie zal met minimale belasting worden uitgevoerd.

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.

gewichtsverlies en verandering gedrag/lichaamshouding.

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

1%

K. Classificatie van ongerief

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

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

organen worden gebruikt voor isolatie van cellen/in vitro kweken

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.814.005
2. Titel van het project : Een in vitro endometrium model voor toxicologisch onderzoek
3. Titel van de NTS : Een in vitro baarmoeder model voor toxicologisch onderzoek

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: 17-04-2015
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 22-04-2015
- anderszins behandeld: emailronde 07-05-2015
- termijnonderbreking(en) van / tot : 28-04-2015 tot 06-05-2015
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 01-06-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 28-04-2015
- Strekking van de vraag / vragen:
M.b.t. de NTS is de volgende vraag gesteld:
 - 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: De DEC verzoekt u eerst het primaire doel te vermelden. Graag aanpassen.

M.b.t. het projectvoorstel heeft de DEC de volgende vragen gesteld.

- 3.1, achtergrond: De DEC vraagt zich af of u ervan op de hoogte bent dat er reeds een alternatief bestaat voor het rattenmodel voor endometrium kweken, zie onderstaande referenties. Dit model zou nog veel minder proefdieren verbruiken, en in de referenties wordt zelfs gewerkt met humane endometrium organoid culturen, zodat proefdier gebruik geheel vermeden zou kunnen worden en resultaten van de in vitro proeven nog beter bij de humane situatie zouden aansluiten. De DEC vraagt zich af of u aan deze methode heeft gedacht en waarom deze al dan niet geschikt zou zijn. De DEC verzoekt u dit ook weer te geven in de projectaanvraag.
- 3.1, achtergrond: De DEC begrijpt dat u onder meer wilt onderzoeken of de ovariectomie effect heeft op de biomarkers. Dit wordt echter niet helemaal duidelijk uit uw tekst. Graag verhelderen.

Referenties:

A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate.

Bläuer M, Heinonen PK, Martikainen PM, Tomás E, Ylikomi T.

Hum Reprod. 2005 Apr;20(4):864-71. Epub 2005 Jan 21.

PMID: 15665014

Effects of tamoxifen and raloxifene on normal human endometrial cells in an organotypic in vitro model.

Bläuer M, Heinonen PK, Rovio P, Ylikomi T.

Eur J Pharmacol. 2008 Sep 11;592(1-3):13-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.06.091. Epub 2008 Jul 2.

PMID: 18638473

- Datum antwoord: 07-05-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

M.b.t. de NTS heeft de onderzoeker heeft de onderzoeker het primaire doel verduidelijkt en dit aangepast in de NTS.

M.b.t. het projectvoorstel heeft onderzoeker als volgt geantwoord:

- Onderzoeker is op de hoogte van het alternatieve model: zoals beschreven in de achtergrond (3.1) en doel (3.2) van het projectvoorstel, is het voorgestelde proefdier onderzoek onderdeel van een project waarbij ook een in vitro model wordt opgezet met primair humaan weefsel. Hiertoe wordt bij een METC een aanvraag ingediend voor het verkrijgen van premenopausaal endometrium weefsel. De beoogde methode volgens Chen et al (2013), waarnaar in de tekst wordt verwezen, is vergelijkbaar met de door de DEC gesuggereerde artikelen.

Onderzoeker is het geheel eens met de DEC dat de voorkeur uitgaat naar een humaan model, aangezien daarvoor geen proefdieren nodig zijn en de resultaten mogelijk beter

vertaalbaar zijn voor de humane situatie. Een probleem is echter dat de huidige (toxicologische) risicobeoordeling van chemische stoffen tot nu toe nog voornamelijk gedaan wordt met in vivo studies bij ratten en/of muizen, ondanks dat de vertaalbaarheid hiervan naar de humane situatie niet altijd duidelijk is. Bij deze studies worden regelmatig endometriale effecten van hormoonverstorende stoffen gevonden. Echter, gezien de verschillen in hormoonhuishouding tussen rat en mens is het maar de vraag wat de humane relevantie is van de endometriale effecten bij ratten. Dit is tot nu toe nog niet goed onderzocht. Om deze vraag goed te kunnen onderzoeken en mechanistisch te kunnen beantwoorden wordt binnen dit project ook een in vitro endometrium model opgezet met humane cellen volgens de methode van Chen et al. [Chen2013]. Data uit het ratten endometriummodel kunnen vergeleken worden met bestaande vivo data(bases), data van het humane celmodel kan voor bekende stoffen (zoals dioxines) met epidemiologische data vergeleken worden. Op deze manier kunnen de effecten die in vivo bij ratten gevonden worden mechanistisch beter onderzocht worden en levert het informatie op m.b.t. de vertaalbaarheid naar de humane situatie. De resultaten uit het ratten en humane endometriummodel zullen ook worden vergeleken v.w.b. voorspelbaarheid/toepasbaarheid, haalbaarheid (verkrijgen van weefsel) en reproduceerbaarheid. Het meest geschikte model kan in de toekomst worden gebruikt om een toxicologische risicoschatting te maken voor endometriale effecten van lichaamsvreemde stoffen. In dit project willen onderzoekers een uitspraak doen over toepasbaarheid en voorspelbaarheid van het ratten en humane in vitro endometriummodel. De verwachting is dat het humane model prevaleert boven het ratten model, zodat deze toegepast kan worden voor testen van stoffen en er geen verdere studies met rattenendometrium meer nodig zijn. De kennis uit dit project zal verder bijdragen aan het voorkomen van endometriale effecten bij mensen als gevolg van blootstelling aan hormoonverstorende stoffen en het verminderen van proefdieren in toxicologische risicobeoordeling. NB: voor het gebruik van humane primaire cellen wordt bij de Medisch Ethische Toetsingscommissie toestemming gevraagd. Bovenstaande informatie is toegevoegd aan 3.1 Achtergrond en ook in de NTS is dit verduidelijkt.

- De informatie over de pilot naar de noodzaak voor ovariectomie is als volgt uitgebreid: Omdat het vanuit de literatuur onduidelijk is hoe groot de invloed van endogene hormonen is op de respons in endometriale cellen [Arslan1995; Piva1996; Groothuis2007], zal in een pilot studie eerst het effect van ovariectomie voorafgaand aan de endometrium isolatie worden onderzocht. Daartoe zullen endometriale cellen worden geïsoleerd van ratten die ovariectomie hebben ondergaan en ratten waarbij dat niet is uitgevoerd. Veranderingen in biomarkers (zoals expressie van hormoonreceptoren en afgifte van hormonen en chemokines) na in vitro blootstelling aan hormonen zullen worden bepaald in de celkweken afkomstig van endometria met/zonder ovariectomie en worden beoordeeld op fysiologische relevantie. Nadat normale hormoonresponsen zijn vastgesteld, zal worden besloten of ovariectomie noodzakelijk is voor het in vitro model.

Hierna wordt de methode vastgesteld en kan het in vitro endometriummodel gebruikt worden voor het testen van versturende effecten van lichaamsvreemde stoffen.

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

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
 - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
 - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
 - wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek beoogt een celmodel van de baarmoeder te ontwikkelen, waarmee getest kan worden of chemische stoffen of medicijnen schadelijke effecten kunnen veroorzaken aan de baarmoeder, zodat maatregelen genomen kunnen worden om gezondheidsrisico's en ziektes van de baarmoeder bij vrouwen te voorkomen.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)

- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is inschat als licht. De dieren ondergaan een ovariectomie onder narcose dan wel vaginale cytologie voor het isoleren van endometriale cellen en worden 10 dagen nadien gedood. De dieren kunnen ongerief ondervinden van het verwijderen van de ovaria. Om die reden zullen de dieren na narcose goed gemonitord worden om eventueel ongerief tijdig te signaleren. Gezien de handelingen en het eventuele ongerief dat optreedt na ovariectomie is de DEC van mening dat dit een realistische inschatting is.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Naast het ontwikkelen van een baarmoeder celmodel met cellen van ratten wordt een vergelijkbaar baarmoeder model opgezet met cellen van mensen. De uitkomsten van het ratten-baarmoedermodel kunnen dan vergeleken worden met het humane-baarmoeder model om te onderzoeken of de ratten- en de humane cellen hetzelfde reageren op hormonen en chemische stoffen. Op basis van de uitkomsten van dit project zal een model gekozen worden wat voor toekomstig toxicologisch onderzoek gebruikt kan worden. Het is aannemelijk dat het humane baarmoeder celmodel het meest relevante model zal zijn. Humaan gezondheidsschadelijke effecten kunnen dan in de toekomst onderzocht worden in dit in vitro model in plaats van in een in vivo ratten model.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzicht van de gekozen strategie en looptijd. Daarnaast wordt bij het baarmoeder celmodel gebruik gemaakt van primaire cellen. Dat betekent dat met cellen uit één rattenbaarmoeder meerdere stoffen in meerdere concentraties getest kunnen worden, waardoor minder proefdieren nodig zijn.
9. De DEC is van mening dat het project in overeenstemming is met de vereiste ten aanzien van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is gekozen voor de meest geschikte diersoort, namelijk Sprague-Dawley ratten. Veel toxicologische testen worden uitgevoerd met ratten en ook in het

laboratorium van de onderzoekers in deze studie is al ruime ervaring met het kweken van ratten baarmoedercellen. Hierdoor is het ook mogelijk resultaten uit voorgaande studies te gebruiken voor het efficiënt opzetten van dit celmodel. Daarnaast zullen de dieren niet aan in vivo experimenten worden blootgesteld en wordt eerst onderzocht of ovariectomie daadwerkelijk noodzakelijk is voor het isoleren van endometriale cellen, of dat deze door middel van vaginale cytologie geïsoleerd kunnen worden. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk het maken van een in vitro endometrium model waarin de hormonale effecten van lichaamsvreemde stoffen getest kunnen worden, substantieel is en opweegt tegen het lichte ongerief dat de dieren in dit onderzoek zullen ondervinden.

Subsidiar kan dit onderzoek bijdragen aan het verminderen van proefdieren in toxicologische risicobeoordeling of zelfs bijdragen aan een alternatieve methode voor deze risicobeoordeling. Het projectvoorstel is onderdeel van een project waarbij ook een in vitro model wordt opgezet met humane baarmoedercellen. De verwachting is dat het humane model prevaleert boven het ratten model, zodat deze in de toekomst toegepast kan worden voor het testen van stoffen en er geen verdere studies met rattenendometrium meer nodig zijn.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is.
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren.
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens een ministeriële ontheffing vereist.
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015135

Bijlagen

2

Datum 08-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 5 juni 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015135. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. 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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juli 2015
Geplande einddatum: 1 juli 2020
Titel project: Een in vitro endometrium model voor toxicologisch onderzoek
Titel niet-technische samenvatting: Een in vitro endometrium model voor toxicologisch onderzoek
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

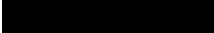
Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Utrecht
Datum: 5 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015135

Bijlagen

2

Datum 08-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 8 juni 2015

Vervaldatum: 8 juli 2015

Factuurnummer: 201570135

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015135	€ 741,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Nederland

**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
AVD108002015135

Uw referentie

Bijlagen
geen

Datum 17-juni-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte mevrouw [REDACTED],

Op 05-juni-2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project met als titel 'Een in vitro endometrium model voor toxicologisch onderzoek', met aanvraagnummer AVD108002015135. 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:

U geeft aan tot 225 dieren nodig te hebben voor het onderzoek. Onderliggend heeft u aangegeven hoeveel groepen en aantallen per testgroep u nodig heeft. U geeft bij 3.4.1 in de projectaanvraag aan dat u in de eerste stap twee maal 6 dieren gebruikt en in de andere stappen ongeveer 15. Bij de experimentele aanpak in de Bijlage Dierproef begint u met de mededeling dat er uit 6 dieren een bepaald aantal cellen te halen valt. Verder gaat u uit van een hoeveelheid van 15 secties en 15 dieren per sectie. Daarmee is voor ons onduidelijk of de twee groepen met zes dieren in stap 1 nu wel of niet meegerekend zijn. Als dat niet zo is dan is het te verwachten aantal dieren hoger dan 225 en als dat wel zo is, dan is het onduidelijk of en waarom er dan van 6 (projectaanvraag) of 15 dieren (beschrijving dierproef) wordt uitgegaan en of en waarom dit gevolgen heeft voor het totaal aantal dieren.

Kunt u deze onduidelijkheid toelichten door aan te geven welke groepen en aantallen dieren u in welke fase gebruikt en tot welk totaal aantal te verwachten dieren dit leidt?

Correcte informatie over de te gebruiken aantallen dieren is belangrijk omdat getoetst wordt of de baten opwegen tegen de hoeveelheid ongerief die in totaal te

verwachten valt. Zo een toets moet wel op basis van correcte informatie gedaan worden.

Datum

17 juni 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD108002015135

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres

postadres

uw kenmerk
ons kenmerk

datum 24 juni 2015
onderwerp Antwoorden AVD108002015135

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u de antwoorden van de onderzoeker op uw brief d.d. 17 juni 2015.

Met vriendelijke groet



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Nederland

**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
AVD108002015135

Uw referentie

Bijlagen

geen

Datum 17-juni-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte mevrouw [REDACTED],

Op 05-juni-2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project met als titel 'Een in vitro endometrium model voor toxicologisch onderzoek', met aanvraagnummer AVD108002015135. 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:

U geeft aan tot 225 dieren nodig te hebben voor het onderzoek. Onderliggend heeft u aangegeven hoeveel groepen en aantallen per testgroep u nodig heeft. U geeft bij 3.4.1 in de projectaanvraag aan dat u in de eerste stap twee maal 6 dieren gebruikt en in de andere stappen ongeveer 15. Bij de experimentele aanpak in de Bijlage Dierproef begint u met de mededeling dat er uit 6 dieren een bepaald aantal cellen te halen valt. Verder gaat u uit van een hoeveelheid van 15 secties en 15 dieren per sectie. Daarmee is voor ons onduidelijk of de twee groepen met zes dieren in stap 1 nu wel of niet meegerekend zijn. Als dat niet zo is dan is het te verwachten aantal dieren hoger dan 225 en als dat wel zo is, dan is het onduidelijk of en waarom er dan van 6 (projectaanvraag) of 15 dieren (beschrijving dierproef) wordt uitgegaan en of en waarom dit gevolgen heeft voor het totaal aantal dieren.

Kunt u deze onduidelijkheid toelichten door aan te geven welke groepen en aantallen dieren u in welke fase gebruikt en tot welk totaal aantal te verwachten dieren dit leidt?

Correcte informatie over de te gebruiken aantallen dieren is belangrijk omdat getoetst wordt of de baten opwegen tegen de hoeveelheid ongerief die in totaal te

verwachten valt. Zo een toets moet wel op basis van correcte informatie gedaan worden.

Datum

17 juni 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015135

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.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

Aanvullende informatie bij aanvraag AVD108002015135

U geeft aan tot 225 dieren nodig te hebben voor het onderzoek. Onderliggend heeft u aangegeven hoeveel groepen en aantallen per testgroep u nodig heeft. U geeft bij 3.4.1 in de projectaanvraag aan dat u in de eerste stap twee maal 6 dieren gebruikt en in de andere stappen ongeveer 15. Bij de experimentele aanpak in de Bijlage Dierproef begint u met de mededeling dat er uit 6 dieren een bepaald aantal cellen te halen valt. Verder gaat u uit van een hoeveelheid van 15 secties en 15 dieren per sectie. Daarmee is voor ons onduidelijk of de twee groepen met zes dieren in stap 1 nu wel of niet meegerekend zijn. Als dat niet zo is dan is het te verwachten aantal dieren hoger dan 225 en als dat wel zo is, dan is het onduidelijk of en waarom er dan van 6 (projectaanvraag) of 15 dieren (beschrijving dierproef) wordt uitgegaan en of en waarom dit gevolgen heeft voor het totaal aantal dieren.

Antwoord:

Het aantal van 225 dieren is het maximale aantal dieren dat binnen dit project mogelijk gebruikt gaat worden. Zoals ik heb aangegeven in de Beschrijving Dierproef, is de schatting van het aantal dieren gebaseerd op het aantal cellen wat in pilot studies geïsoleerd kon worden.

De eerste pilot, waarbij we de noodzaak van ovariectomie willen onderzoeken alsmede het celisolatie protocol willen optimaliseren, zal bestaan uit 6 dieren mét ovariectomie, 6 dieren zonder ovariectomie en 3 dieren voor optimalisatie van celprotocol. Deze laatste 3 dieren zijn nodig voor optimalisatie van het celisolatie protocol, zodat we er zeker van zijn dat we voldoende cellen kunnen isoleren voor voldoende controle experimenten. Deze dieren zullen geen ovariectomie ondergaan. Deze had ik inderdaad niet expliciet genoemd, waarvoor excuus.

Het totaal aantal dieren wat binnen dit project gebruikt zal worden hangt af van twee factoren. Ten eerste de celopbrengst per dier; ik hoop na de eerste pilot met minder dieren per sectie toe te kunnen door de opbrengst van aantal cellen per dier te optimaliseren. Ik ben in de berekening echter uitgegaan van maximaal 15 dieren per sectie. Ten tweede hangt het aantal dieren af van de uitkomsten van de studies; indien het humane endometrium model afdoende werkt zullen er minder stoffen getest worden in het rattenmodel. Dat betekent voor het totaal aantal dieren dat voor de pilot er $6+6+3=15$ dieren gebruikt zullen worden, voor eerste serie stoffen testen 5-7 secties met (maximaal) 15 dieren= 105 dieren. Bij positieve resultaten, i.e. goede voorspelbaarheid van het ratten model, zullen meer stoffen getest worden in maximaal 5-7 additionele secties met maximaal 15 dieren = 105 dieren. Dit betekent een totaal *maximum* aantal dieren van $15+105+105=225$ dieren.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

Nederland

Universiteit 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
AVD108002015135

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 27-07-2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 05-06-2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project met als titel 'Een in vitro endometrium model voor toxicologisch onderzoek' met aanvraagnummer AVD108002015135. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project 'Een in vitro endometrium model voor toxicologisch onderzoek' starten. De vergunning wordt afgegeven vanaf dagtekening van deze brief tot en met 01-07-2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd d.d. 01-06-2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

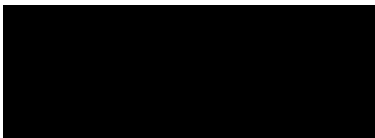
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



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

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

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Universiteit Utrecht
Adres: [REDACTED]
Postcode en woonplaats: [REDACTED] Utrecht
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak vanaf dagtekening van deze brief tot en met 01-07-2020, voor het project 'Een in vitro endometrium model voor toxicologisch onderzoek' met aanvraagnummer AVD108002015135, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair Docent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 05-06-2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 05-06-2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 05-06-2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 05-06-2015
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 24-06-2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Proef 1: Ovariectomie en, na euthanasie, hysterectomie rat	rat	225	licht	geen

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdooving

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

Einde van een dierproef

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

Datum
27-07-2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015135

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W15-12									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015152								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Factuur				x		x	x	
9	Mail factuur 6-7-2015				x		x	x	
10	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
11	Mail aanvulling DEC 20-7-2015				x		x	x	
12	Mail aanvullende vragen 22-7-2015				x		x	x	
13	Mail aanvullende info 23-7-2015				x		x	x	
14	Formulier aanvullende informatie				x		x	x	
15	Acceptatiebrief				x		x	x	
16	Advies CCD I		x						x
17	Beschikking				x		x	x	
18	Advies CCD II		x						x
20	Mail reactie DEC 7-8-2015				x		x	x	
21	Mail beschikking I 28-8-2015				x		x	x	
22	Mail beschikking II 2-9-2015				x		x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

AVD 401002015152

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl 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	40100
		<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	Stichting DLO
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	9098104
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	[REDACTED] 12
		Postbus	[REDACTED]
		Postcode en plaats	[REDACTED] Wageningen
		IBAN	NL10 RABO 0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
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	Senior scientist
		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] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Senior Scientist
		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 - 9 - 2015 |
| Einddatum | 1 - 9 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bepalen van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------|
| Naam DEC | DEC WU |
| Postadres | Wageningen |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel + Bijlagen Beschrijving dierproeven (3x)
- Niet-technische samenvatting
- DEC-advies
Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging [REDACTED]
- Inkooporder [REDACTED]

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 Wageningen

Datum 2 - 7 - 2015

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
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Darmgezondheid is van groot belang voor onze algehele gezondheid. In de darmen vindt een groot deel van de spijsvertering, cholesterolregulatie en energieopname plaats. Ook worden afvalstoffen uitgescheiden via de darm waardoor een goede stoelgang belangrijk is. Verder bevindt het grootste gedeelte van ons immuunsysteem zich in de darm. Het immuunsysteem moet heel specifiek onderscheid maken tussen gezonde microbiota en schadelijke pathogenen en heeft een belangrijke rol in het instrueren van het immuunsysteem in de rest van het lichaam. Er zijn ook aanwijzingen dat je darm een directe interactie heeft met je hersenen. Als al deze processen goed verlopen en optimaal functioneren spreken we van een gezonde darm.

Een belangrijke voorwaarde voor een gezonde darm is een goede darmintegriteit. Onder een goede darmintegriteit verstaan we een stabiele barrière waarbij individuele darmcellen een sterke interactie met elkaar hebben en ongewenste indringers, zoals microbiota of pathogenen, tegenhouden. Wanneer de darmintegriteit verminderd is, is de darmpermeabiliteit verhoogd en kunnen microbiota, pathogenen, toxines of endotoxines eenvoudig het lichaam binnendringen. Dit leidt tot een overmatige immuunstimulatie en darminflammatie wat kan resulteren in verder verzwakte darmintegriteit en verhoogde darmpermeabiliteit, maar ook tot andere klachten zoals diarree.

Onderzoek aan prebiotica en probiotica heeft de laatste jaren een enorme vlucht genomen en hieruit bleek dat prebiotica en probiotica de darmgezondheid sterk kunnen bevorderen zoals uitgebreid is beschreven in de wetenschappelijke literatuur. Dit gebeurt voornamelijk door directe interacties met cellen in de darmwand en het beïnvloeden van de microbiotasamenstelling. Naast het verbeteren van darmgezondheid kunnen prebiotica en probiotica ook meer systemische gezondheidseffecten bewerkstelligen. Zo is beschreven dat prebiotica en probiotica

- darmgezondheid/-integriteit kunnen verbeteren
- het immuunsysteem kunnen instrueren wat leidt tot verbeterde immuunresponsen
- het cholesterolmetabolisme beïnvloeden en daarmee plasmacholesterol kunnen verlagen
- positieve effecten kunnen hebben op dieetgeïnduceerde karakteristieken van het metabool syndroom, e.g. glucose-intolerantie, obesitas, leververvetting

Deze gezondheidsbevorderende effecten zijn echter slechts beschreven voor een beperkte groep prebiotica en probiotica en bovendien zijn de mechanismes achter deze gezondheidsbevorderende effecten vaak niet of slechts beperkt bekend.

In dit project willen we van 'nieuwe' prebiotica en/of probiotica onderzoeken of ze bij kunnen dragen aan de darmgezondheid en algehele gezondheid. Het onderzoek zal zich met name richten op potentiële versterking van het immuunsysteem, verbetering van de darmintegriteit, verlaging van het cholesterolgehalte en verbeteren van de karakteristieken van het metabool syndroom. Daarnaast willen we beter inzicht krijgen in het mechanisme achter deze effecten van prebiotica en probiotica. Voor de prebiotica en probiotica die gebruikt zullen worden in de muizenstudies zal een preselectie plaatsvinden via *in-vitro*-studies, gebaseerd op indicatieve resultaten voor een potentiële gezondheidsbevorderende werking. Voor dit *in-vitro*-onderzoek maken we gebruik van darmcelkweekmodellen (transwells), verscheidene immuuncelkweken en levercelkweken. De darmmodellen geven ons inzicht in effecten van prebiotica en probiotica op darmgezondheid (darmwandintegriteit) en cholesterolregulatie. De cholesterolregulatie en vetopslag in levercellen geven informatie over effecten van prebiotica en probiotica op karakteristieken van het metabool syndroom, zoals cholesterolgehalte en leververvetting. De immuuncelkweken laten zien of de prebiotica en probiotica immuunstimulerend of -remmend werken.

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?

Algemene doelstelling

De algemene doelstelling van dit project is het identificeren en valideren van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en/of probiotica met betrekking tot (1) darmgezondheid/darmpermeabiliteit, (2) het immuunsysteem, (3) de cholesterolregulatie, en (4) karakteristieken van het metabool syndroom. Bovendien wordt geanalyseerd welk werkingsmechanisme hieraan ten grondslag ligt. Mochten de geteste prebiotica en probiotica een sterk gezondheidsbevorderend effect laten zien in muizen, met een onderliggend werkingsmechanisme dat ook humaan relevant kan zijn, dan is de kans aanzienlijk dat dit prebiotica en/of probiotica ook in mensen een positief effect kan hebben op de gezondheid. Het logische vervolg zou dan zijn om dit te valideren in een humane interventiestudie.

Prebiotica en probiotica hebben de potentie om op verschillende manieren sterk bij te dragen aan algehele gezondheid en kunnen op eenvoudige wijze worden toegediend als additief aan voedsel. We willen met dit onderzoek zowel bijdragen aan de kennis die er wordt opgebouwd rondom prebiotica en probiotica als wel specifiek analyseren welke (nieuwe) gezondheidsbevorderende eigenschappen (nieuwe) prebiotica en probiotica hebben die binnen ons project beschikbaar zijn en onderzocht zullen worden. Deze varianten hebben mogelijk sterkere gezondheidsbevorderende effecten dan al bekende prebiotica en probiotica. Bovendien is het wenselijk meerdere opties te hebben voor gezondheidsbevorderende prebiotica en probiotica, want dit maakt een bredere en meer gerichte bediening van de mens mogelijk, gezien de individuele behoeften die van mens tot mens sterk kunnen verschillen.

Haalbaarheid project

Haalbaarheid studie

Er zal een preselectie van de prebiotica en probiotica plaatsvinden via *in-vitro*-onderzoek om de meest veelbelovende prebiotica en probiotica met gezondheidsbevorderende effecten te selecteren voor verder onderzoek in onze dierstudies. In deze dierstudies worden proefopzetten gebruikt die al veelvuldig zijn beschreven in de literatuur en resultaten bieden voor:

- 1) darmgezondheid: analyse van darmpermeabiliteit d.m.v. FITC-dextrantesten
- 2) Immuunactiviteit: analyse van antigeen specifieke reacties na sensitisatie
- 3) cholesterolmetabolisme: analyse van cholesterol (totaal, LDL, HDL) in bloed
- 4) metabool syndroom: analyse van leververvetting, obesitas, glucose-intolerantie

Omdat de voorgestelde analyses in onze dierstudies al veelvuldig zijn beschreven in de literatuur en sommige ook uitgevoerd door mensen binnen onze eigen vakgroep zelf, is de slagingskans groot. Medewerkers met specifieke kennis van het immuunsysteem, werking van de darm, cholesterolregulatie en metabool syndroom zullen bovendien betrokken zijn bij deze proeven. Daarnaast is voor sommige analyses ook al het effect van bepaalde prebiotica en/of probiotica beschreven waardoor het ook mogelijk is om een goede powercalculatie uit te voeren.

Kortom, door de combinatie van relevante kennis en expertise van de uitvoerende personen/vakgroep, beschikbare achtergrondkennis van prebiotica en probiotica in het algemeen, de *in-vitro*-voorselectie, het gebruik van gevalideerde proefopzetten en de mogelijke vertaling naar de humane situatie, lijkt ons de haalbaarheid van onze algemene doelstelling zeer reëel.

3.3 Belang

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

Zoals hierboven beschreven laat eerder onderzoek al zien dat prebiotica en probiotica sterke effecten kunnen hebben op darmgezondheid, het immuunsysteem, cholesterolregulatie en het metabool syndroom. Deze onderzoeksgebieden hangen nauw samen met verschillende ziektebeelden/aandoeningen waar grote groepen mensen last van hebben:

Darmgezondheid: Op dit moment leiden alleen al in Nederland meer dan 30.000 mensen aan inflammatoire darmziekten (IBD: ziekte van Crohn of Colitis ulcerosa). De symptomen van deze ziekten

kunnen zeer ernstig zijn en de kwaliteit van leven zeer nadelig beïnvloeden. De oorzaak van deze symptomen ligt deels in een verminderde darmwandintegriteit en deels in ontstekingsreacties. Door het verstevigen van de darmwand zouden symptomen van deze ziektes drastisch verminderd kunnen worden.

Immuunresponsen: In geval van inflammatoire darmziekten is het wenselijk bepaalde immuunresponsen in de darm te reduceren. Anderzijds, in oudere mensen, die met de huidige vergrijzing een steeds grotere populatie binnen Nederland vormen, neemt de activiteit van het immuunsysteem geleidelijk af. Voornamelijk de type-I afweer verzwakt significant. Binnen deze populatie is het wenselijk het immuunsysteem te versterken om zo infectieziekten beter te kunnen voorkomen en bestrijden. Vaccinaties worden nu veelal gebruikt om het immuunsysteem voor een specifieke infectieziekte te versterken. De efficiëntie van deze vaccinaties zou ook verder verbeterd worden door een sterker immuunsysteem. Er zijn prebiotica en probiotica beschreven die het immuunsysteem kunnen remmen, maar ook die het immuunsysteem kunnen activeren. Daarom is het van belang te bepalen wat de effecten op het immuunsysteem zijn van nieuwe prebiotica en probiotica.

Cholesterolregulatie: Elke dag overlijden meer dan 100 mensen in Nederland aan hart- en vaatziekten en heeft een grote populatie hoge cholesterol niveaus. Om de risicofactoren te beperken is het wenselijk LDL-cholesterol te verlagen en HDL-cholesterol te verhogen. Dit kan met door meer te bewegen, gerichte voeding waardoor men minder cholesterol binnen krijgt, of door voeding te supplementeren met prebiotica en probiotica waardoor de ratio HDL/LDL-cholesterol positief wordt beïnvloed.

Metabool syndroom: Voorbeelden van karakteristieken van het metabool syndroom zijn leververvetting, obesitas, diabetes en glucose-intolerantie. Deze karakteristieken van het metabool syndroom hebben veel overlap en komen vaak in combinatie tot uiting. Een groeiende groep Nederlanders wordt geconfronteerd met symptomen van deze aandoeningen en zou gebaat zijn bij een betere controle van hun vet- en suikerhuishouding. Prebiotica en probiotica kunnen daarbij een rol spelen.

In dit project willen we verschillende prebiotica en probiotica *in vitro* gaan analyseren op hun potentie om een positieve invloed te hebben op bovenstaande ziektes/aandoeningen. Op deze manier hopen we bij te kunnen dragen aan de preventie en/of behandeling van deze ziektes/aandoeningen waar zoveel mensen aan leiden en de kwaliteit van leven te verbeteren. Een groot voordeel van gebruik van voedsel(componenten) zoals prebiotica en probiotica is dat deze in de voeding verwerkt kunnen worden en zo op een eenvoudige manier bij kunnen dragen aan de gezondheid van mensen. Ondanks dat er al prebiotica en probiotica beschreven zijn die positieve effecten hebben op hierboven beschreven symptomen/ziektebeelden is er nog altijd noodzaak voor onderzoek naar nieuwe gezondheidsbevorderende effecten van nieuwe of bestaande prebiotica en probiotica. Daarnaast kan het vanuit het oogpunt van 'personalized nutrition' goed zijn dat er meerdere opties voor gezondheidsbevorderende prebiotica en probiotica voor handen zijn vanwege de individuele behoeften die van mens tot mens sterk kunnen verschillen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Binnen de algehele strategie volgen de muizenstudies op uitgebreid *in-vitro*-werk. Met onze *in-vitro*-modellen worden prebiotica en probiotica geselecteerd op potentie om een positieve invloed te hebben op de verschillende bovengenoemde ziektes/aandoeningen. Dit wordt gedaan om de kans op bevestigende resultaten vanuit de dierenstudies te vergroten.

Na de *in-vitro*-voorselectie, zullen de prebiotica en probiotica met potentiële gezondheidsbevorderende effecten worden gevalideerd in de muizenstudies. Bovendien zullen we onderzoeken welke werkingsmechanismen ten grondslag liggen aan de positieve effecten van prebiotica of probiotica. Met name het isoleren van organen, zoals de darm, lever, milt zullen aan het einde van de proeven gedetailleerde informatie opleveren wat niet mogelijk zou zijn in een humane studie. Het uiteindelijke doel is om prebiotica en/of probiotica te identificeren die later in humane studies kunnen worden

gevalideerd op positieve effecten op de immuunbarrière, cholesterolregulatie en/of karakteristieken van het metabool syndroom.

We voeren de interventiestudies uit met C57Bl6-J-strain-dieren die na hun 'pubertijd' zitten, 9+ weken oud, en van het mannelijk geslacht zijn. Deze keuzes zijn erop gericht om te voorkomen dat de proefopzet en analyses beïnvloed worden door groei-/ontwikkelingsprocessen en mogelijke fluctuerende hormoon spiegels zoals wordt gezien in vrouwtjesmuizen. Wij realiseren ons dat de ziektebeelden die worden geanalyseerd binnen ons project en het gebruik van prebiotica en probiotica belangrijk zijn voor mannen en vrouwen, maar er is toch bewust gekozen om in dit project alleen muizen van het mannelijke geslacht te gebruiken. Bij vrouwtjes kan de oestrische/menstruele cyclus de resultaten van de proef zodanig beïnvloeden dat een groter aantal proefdieren vereist zou zijn om significante resultaten te behalen. Met name van genexpressieprofielen en cholesterolspiegels in bloed is bekend dat deze kunnen fluctueren afhankelijk van de hormoonspiegels in vrouwen (~20% variatie). Daarom is het erg belangrijk om steeds in dezelfde fase van de cyclus te samplen bij alle vrouwelijke muizen om een representatief beeld te krijgen van het effect van de voedingscomponent. Het controleren/monitoren van de menstruele cyclus in vrouwtjesmuizen zou de opzet van onze proef aanzienlijk complexer maken en zou meer handelingen aan de muizen met zich meebrengen. En als we geen rekening zouden houden met de oestrische/menstruele cyclus in vrouwtjesmuizen zou de spreiding in de resultaten veel groter zijn en dus zouden meer muizen moeten worden geïncubeerd om significante resultaten te behalen. In een humane studie is deze oestrische/menstruele cyclus beter te controleren/monitoren dan in muizen en speelt dit fenomeen dus een minder grote rol omdat makkelijker rekening kan worden gehouden met de timing van samplen. Vandaar dat we in ons project nu alleen mannelijke muizen includeren om de variatie die wordt geïnduceerd door de oestrische/menstruele cyclus te voorkomen en we dus meer gecontroleerd de resultaten kunnen verkrijgen en interpreteren. Om een goede vergelijking tussen alle dierstudies binnen dit project te kunnen maken, willen we voor alle dierstudies alleen mannetjesmuizen inzetten. Het gebruik van alleen mannelijke muizen levert bovendien ook een effectievere vergelijking op met eerdere soortgelijke studies die al zijn beschreven in de literatuur.

We hebben specifiek gekozen voor het gebruik van inbred C57Bl/6J-muizen, omdat vanuit de literatuur al bekend is dat deze muizen een goed modelsysteem zijn voor onderzoek naar darmgezondheid, het immuunsysteem, cholesterolregulatie en ziektebeelden gerelateerd aan het metabool syndroom. In outbred muizen zijn deze ziektebeelden, die van nature met name in mensen voorkomen en problemen veroorzaken (zoals verhoogd cholesterol en metabool syndroom), niet of nauwelijks te induceren.

De dierenstudies zelf hebben 3 speerpunten die gekozen zijn omdat dit de voornaamste gezondheidsbevorderende effecten zijn die beschreven zijn voor prebiotica en probiotica:

- Versterking darmwandintegriteit en immuunrespons
- Verbeterde cholesterol regulatie
- Vermindering symptomen van metabool syndroom

De dierstudies worden niet in een vooraf vastgelegde volgorde uitgevoerd. Onze *in-vitro*-data zijn leidend in de opzet/volgorde van de dierstudies.

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

- Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. versterking van darmwandintegriteit en immuunrespons:

Mannelijke C57Bl/6-(J-strain)-muizen zullen bij binnenkomst 7 weken oud zijn. Na 2 weken acclimatisatie zal de interventie worden gestart, waarin een hoogvetdieet wordt gecombineerd met prebiotica en/of probiotica. Tijdens de interventie die 8 weken duurt worden de muizen wekelijks gewogen, de darmwandintegriteit onderzocht en immuunresponsen gemeten. Aan het eind van de proef worden de dieren geofferd en organen geïsoleerd voor verdere analyse. We hebben 11 dieren per groep nodig om significante verschillen te meten in darmintegriteit. Per proef kunnen we maximaal 4 groepen hanteren en we willen de proef binnen de duur van dit protocol maximaal 2 keer uitvoeren. In totaal zouden we dan 92 dieren gebruiken.

- Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. van verbeterde cholesterolregulatie:
Voor het analyseren van prebiotica- en probiotica-effecten op cholesterolregulatie wordt een zeer vergelijkbare proefopzet gebruikt als voor de bovengenoemde proef. Na de acclimatisatieperiode worden C57Bl/6J-muizen overgezet op een HFD, maar nu met additie van 1.25% cholesterol. Tijdens de interventie, die ook nu 8 weken duurt, worden de dieren wekelijks gewogen. Na de interventie worden de muizen geofferd, wordt bloed afgenomen en verschillende organen geïsoleerd voor verdere analyse. We hebben 11 dieren per groep nodig om significante verschillen te meten in plasmacholesterol. Per proef kunnen we maximaal 4 groepen hanteren en we willen de proef binnen de duur van dit protocol maximaal 2 keer uitvoeren. In totaal zouden we dan 92 dieren gebruiken.

- Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. preventie en vermindering symptomen van metabool syndroom:

Bij deze proef maken we wederom gebruik van mannetjes C57Bl/6J-muizen die 7 weken oud zijn bij binnenkomst. Na acclimatisatie, start de dieetinterventie en gaan de dieren over op een laagvet- of hoogvetcontroledieet of op een hoogvetdieet gecombineerd met prebiotica en/of probiotica. De muizen worden wekelijks gewogen, de darmwandintegriteit wordt onderzocht en er wordt een glucosetolerantietest uitgevoerd. Na de interventie worden de muizen geofferd en bloed afgenomen en organen geïsoleerd voor verdere analyse. We hebben 10 dieren per groep nodig om significante verschillen te meten in glucose-intolerantie. Per proef kunnen we maximaal 4 groepen hanteren en we willen de proef binnen de duur van dit protocol maximaal 2 keer uitvoeren. In totaal zullen we dan 84 dieren gebruiken.

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.

Zoals in paragraaf 3.1 (Achtergrond) al is toegelicht hebben prebiotica en probiotica al laten zien de gezondheid te kunnen bevorderen. De meest significante effecten zijn gevonden in:

- darmgezondheid/-integriteit
- het immuunsysteem
- cholesterolregulatie
- metabool syndroom

Er worden nog altijd nieuwe prebiotica en probiotica ontdekt/gevonden die op bovenstaande processen een positieve invloed kunnen hebben. Meerdere opties voor gezondheidsbevordende prebiotica en probiotica maken een bredere en meer gerichte bediening van de mens mogelijk, gezien de individuele behoeften die van mens tot mens sterk kunnen verschillen. Onderzoek gebeurt meestal vanuit 1 of enkele prebiotica en probiotica gericht op 1 (darmgerelateerd) gezondheidseffect. In dit project willen we van verschillende prebiotica en probiotica onderzoeken of ze positieve invloeden kunnen hebben op 1 of meerdere van de bovengenoemde gezondheidseffecten.

Ook binnen de prebiotica en probiotica zijn er grote verschillen in activiteit als gevolg van herkomst en opwerkingen. Deze verschillen kunnen soms zelfs tot tegenovergestelde functionele effecten leiden. Om de prebiotica en probiotica goed te kunnen differentiëren wat betreft te verwachten *in-vivo*-effecten gebruiken we eerst *in-vitro*-screening tools. Deze tools stellen ons in staat om beter in te schatten of de prebiotica en probiotica *in vivo* een effect zullen hebben op de darmintegriteit en/of immunoresponses, cholesterolregulatie of symptomen van het metabool syndroom en of deze effecten tot een positief resultaat zullen leiden.

Uitkomsten van de *in-vitro*-analyses zullen leiden tot voorspellingen of prebiotica en probiotica een positief effect zullen hebben op de verschillende darmgerelateerde gezondheidseffecten. De verwachting is dat we voor alle effecten prebiotica of probiotica zullen vinden die hier een positief effect op zullen hebben. Door deze opzet zal *in-vitro*-kennis efficiënt worden omgezet in te verwachten *in-vivo*-resultaten.

De opzet van de dier studies zijn zeer vergelijkbaar: we gebruiken mannelijke C57Bl/6J-muizen waarbij

de dieetinterventie start als ze 9 weken oud zijn die allen, om verschillende redenen, op een hoogvetdieet worden gezet. Ze zullen individueel gehuisvest worden om de prebiotica- of probioticainname goed te kunnen meten, waarbij deze door het voer worden gemengd of in een hydrogel wordt aangeboden. Deze overeenkomsten tussen de proeven zullen ertoe leiden dat de resultaten ook te koppelen zullen zijn aan de *in-vitro*-resultaten wat in de toekomst de voorspellende waarde van deze potentiële proeven vergroot.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. versterking van darmwandintegriteit en immuunresponses
2	Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. verbeterde cholesterolregulatie
3	Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. preventie en vermindering symptomen van metabool syndroom
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.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 1 | Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. versterking van darmwandintegriteit en immuunrespons |
- 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.

Mannelijke C57BL/6-(J-strain)-muizen van 7 weken oud zullen individueel worden gehuisvest in een kooi en ze zullen vrije toegang hebben tot water gedurende de gehele proef en vrije toegang tot voer gedurende de gehele proef behalve tijdens de vastenperiodes. Na 1 week op een standaard chowdieet (RMH-B) worden de muizen voor 1 week overgezet op een hoogvetdieet (HFD; 45 kcal% palmolie) zodat de muizen voor de start van de daadwerkelijke dieetinterventie kunnen acclimatiseren/wennen aan de synthetische diëten (uit eerdere experimenten is gebleken dat er betere/betrouwbaardere onderzoeksresultaten kunnen worden behaald door muizen voor de start van de dieetinterventie te laten acclimatiseren aan het synthetische dieet waarbij gebruik wordt gemaakt van gezuiverde grondstoffen). Het gebruik van HFD is noodzakelijk omdat in het standaard chowdieet een significante vezelcomponent zit die in geval van onderzoek naar prebiotica kan zorgen voor versturende effecten. Het specifieke gebruik van HFD als vervanger van de vezelcomponent heeft daarnaast 2 redenen: (1) binnen deze proef analyseren we de positieve effecten van prebiotica en/of probiotica op de barrièrefunctie van de darm. Een HFD resulteert in een verhoogde permeabiliteit van de darm en geeft daarmee een ruimte voor verbetering door prebiotica en/of probiotica (Cani, Diabetes, 2008), (2) bovendien reflecteert het HFD het algemene Westerse humane dieet wat ook een verhoogde vetconsumptie laat zien.

Na de acclimatisatieperiode (in totaal 2 weken), start de daadwerkelijke dieetinterventie met prebiotica en/of probiotica. De controlegroep krijgt alleen het HFD, de overige groepen HFD + prebiotica en/of probiotica. Prebiotica zullen voor de interventie door het voer worden gemengd. Voor probiotica kan deze processing nadelige gevolgen hebben voor de integriteit. Vaak worden probiotica daarom (dagelijks) toegediend via orale gavage, dit geeft echter een behoorlijke stress aan de muizen. Als alternatief zullen in deze studie de probiotica worden aangeboden in een hydrogel (een superabsorberende gel die >99% water

vasthoudt). Uit eerdere experimenten is gebleken dat muizen de probiotica op deze manier goed innemen zonder nadelige bijeffecten.

Tijdens de dieetinterventie van 8 weken zullen de muizen wekelijks worden gewogen om gewichtstoename op de verschillende dieetinterventies vast te stellen. Na 7 weken dieetinterventie wordt een barrièrefunctietest uitgevoerd. Deze test bestaat uit een vasten periode van 5 uur waarbij na 4 uur vasten FITC-Dextran 4 kDa wordt toegediend aan de muizen via orale gavage. Na de 5 uur vasten, en dus 1 uur na toediening van FITC-dextran 4 kDa, wordt via een staartbloeding bloed verzameld voor de analyse van FITC-dextran in bloed. Passage van FITC-dextran is een maat voor de doorlaatbaarheid van de darm wat model staat voor mogelijke translocatie van pathogene bacteriën. De laatste week van de proef wordt een antigeenstimulatie uitgevoerd, volgend op sensitisatie in week 3 en 5 na start van de dieetinterventie, en worden de muizen geofferd, zal bloed worden verzameld via een orbitapunctie en aansluitend zullen organen (darm, lever, vetweefsel, milt, hersenen) en mesenterische lymfeklieren worden verwijderd. Alle samples zullen direct na isolatie worden opgeslagen bij -80.

De primaire uitkomstparameter is de barrièrefunctie van de darm. In geval deze in de hierboven beschreven setting geen significante verschillen oplevert wordt deze barrière test 2 dagen later herhaald op hetzelfde tijdstip met FITC-dextran 20 kDa in plaats van 4 kDa. Uit eerdere experimenten is gebleken dat dit grotere molecuul minder eenvoudig de darmwand passeert waardoor verschillen als gevolg van prebiotica of probiotica toediening uitvergroot worden.

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.

1 Dieetinterventie

Muizen wordt een HFD toegediend omdat dit een laag gehalte in vezels heeft. Bij het testen van prebiotica zal dit daarom geen verstoring geven van de metingen. Afhankelijk van het gebruik van prebiotica en/of probiotica worden de componenten door het voer gemengd of in een hydrogel aangeboden aan de muizen, zoals in **A** toegelicht.

2 Wegen van de dieren

De muizen worden wekelijks gewogen om de gewichtstoename te monitoren

3 Primaire metingen: barrièrefunctie

Na 4 uur vasten wordt FITC-dextran via gavage toegediend en na nog 1 uur vasten wordt bloed afgenomen via een staartbloeding.

- Toediening dient per gavage plaats te vinden om er zeker van te zijn dat exacte hoeveelheden worden toegediend en groepen met elkaar te vergelijken zijn. Daarnaast is het in geval van FITC-dextran noodzakelijk om te kunnen bepalen hoeveel er de barrière passeert (in % van toegediende hoeveelheden).

4 analyseren van de immuunactiviteit

Tijdens de interventie worden de dieren 2 keer, 3 en 5 weken na start van de interventie, per orale gavage gesensitiseerd met niet-levensvatbare OVA-salmonella. De sensitisatie is gericht op het OVA-antigeen. Deze wordt gekoppeld aan salmonella om efficiënt te worden herkend door het immuunsysteem. Salmonella is hiervoor dus noodzakelijk, maar omdat we niet willen dat de dieren ziek worden van de salmonella gebruiken we een niet-levensvatbare vorm waar ze geen hinder van zullen ondervinden. Tijdens de laatste week van de behandeling worden ze gestimuleerd met OVA gemengd in het dieet (14%). OVA-specifieke immuunresponsen zullen 3 keer worden gemeten in afgenomen bloed (1: voor sensitisatie; 2: na sensitisatie en voor OVA-stimulatie; 3: na OVA-stimulatie)

- Gavage is wederom nodig om de exact juiste dosis van verzwakte salmonella toe te kunnen dienen. Enkel via bloedafname kunnen we hierna immuunreacties uitlezen. Het laatste moment van bloedafname zal plaats vinden na anesthesie.

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

Om de aantallen groepen te verminderen en de efficiëntie van het gebruik van proefdieren te vergroten

testen we de prebiotica en probiotica eerste in *in-vitro*-modellen. Deze modellen bootsten de dunne darm en onderliggende immuuncellen na waar de prebiotica en probiotica een eerste en voornaamste effect zullen hebben. Op basis van resultaten van het stimuleren van deze cellijnen wordt een keuze gemaakt welke prebiotica en probiotica potentie laten zien om *in-vivo*-immuun- en darmwandbarrièreversterkende-effecten te hebben.

Het aantal dieren dat nodig is voor een muizenstudie om de effecten van prebiotica en probiotica te analyseren wordt berekend met een powercalculatie. De darmwandpermeabiliteit is gekozen als primaire parameter. Voor de powercalculatie is een recente muizenstudie genomen waarin obese muizen (als gevolg van een genetische mutatie op een C57Bl/6-achtergrond) werden gebruikt die fenotypisch sterk lijken op C57Bl/6 muizen op een HFD (Cani, Gut, 2009). De obese muizen werden behandeld met prebiotica of placebo (normaal dieet) waarbij de prebioticaopname van FITC-dextran 4 kDa zodanig verminderden dat plasmalevels met ~75% waren verlaagd. Deze vermindering in plasmalevels correleerde met verhoogde (~50%) GLP-2-niveaus. Verhoogde GLP-2-niveaus in de mens zijn gecorreleerd aan verbeterde voedselopname, mucosale integriteit en verminderde permeabiliteit (Drucker, Gut, 2002).

Er werd echter wel een grote spreiding tussen de muizen gevonden wat betreft FITC-dextran 4 kDa plasmalevels. Waarden vanuit deze studie zijn: onbetrouwbaarheid van de toets =0,05; onderscheidend vermogen/power =0,80; gemiddelde controle: 360 µg/ml +/- 316; gemiddelde behandeling: 90 µg/ml +/- 25. Dit geeft aan dat er 11 muizen per groep nodig zijn voor significante resultaten.

Aangezien de C57Bl/6J-muizen elders worden besteld (Harlan), zouden we graag 2 extra muizen bestellen in verband met mogelijke 'drop-outs' (door transport/acclimatisatie). Mochten er geen drop-outs zijn tijdens de acclimatisatieperiode dan zullen deze reservemuizen in de HFD controlegroep meelopen het einde van de proef.

B. De dieren

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

Mannelijke C57Bl/6-(J-strain)-muizen worden geleverd door Harlan, Nederland.

7 weken oud bij aankomst in het proefdiercentrum. Dieetinterventie start pas als de muizen 9 weken oud zijn, aangezien het wenselijk is dat de groeispurt voorbij is. Er zullen 11 muizen per dieetgroep nodig zijn.

Er is gekozen voor alleen mannelijke dieren omdat er verschillen bestaan tussen immunoreacties van vrouwelijke en mannelijke dieren, waarbij mannelijke dieren een sterkere Th1-respons laten zien welke verwacht wordt in geval van sensibilisaties. De gezondheidseffecten die we analyseren zijn in de basis wel universele processen. Het includeren van vrouwelijke dieren zou daardoor enkel leiden tot grotere groepen en dus het gebruik van meerdere proefdieren. Ook in de andere proefopzetten binnen dit project worden metingen gedaan waarbij het verschil in geslacht invloed kan hebben op de resultaten. Dus ook voor de totale interpretatie van de resultaten binnen dit project is het belangrijk om overal muizen van hetzelfde geslacht te gebruiken.

Geschatte aantallen dieren:

Zoals hierboven onder kopje **A** uitgewerkt geeft de powercalculatie aan dat we 11 dieren per groep nodig hebben om significante verschillen te kunnen meten. Met deze hoeveelheden per dier kunnen we vanuit een praktisch oogpunt per proef maximaal 4 groepen tegelijk hanteren: 1 controle en 3 waarbij geïntervenieerd wordt met prebiotica of probiotica. Om alle prebiotica en probiotica te kunnen testen die potentie laten zien voor versterking van de darmwandintegriteit en immunorespons willen we de proef 2 maal uitvoeren. Om rekening te houden met uitvallers willen we elke proef graag starten met 2 extra dieren die ingeval er geen uitvallers zijn meegaan in de controlegroepen. In totaal zou dit betekenen dat we 92 dieren willen gebruiken.

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.

Overwegingen in verband met vervanging:

Deze dierenstudie volgt op *in-vitro*-onderzoek waar we cellijnen en primaire cellen blootstellen aan prebiotica en probiotica. Dit betreft o.a. Caco-2-cellen gekweekt in transwells om de darm na te bootsen en monocyttaire cellijnen of primaire cellen om immunresponsen te analyseren. Daarnaast zullen we ook combinaties van deze kweken hanteren om de immunrespons in de darm na te bootsen. Resultaten hiervan kunnen echter slechts een sterke suggestie geven van de te verwachten *in-vivo*-effecten. De gezondheidseffecten die we willen bestuderen vinden de primair plaats in de darm maar de uiteindelijke effecten zijn een resultaat van systemische regulatie. Omdat de complexiteit van deze *in-vivo*-situatie nooit volledig kan worden nagebootst *in vitro* blijft dit een model maar is noodzaak voor *in-vivo*-experimenten.

Voor het uiteindelijke doel: 'het valideren van prebiotica en/of probiotica voor de versterking van de darmwandintegriteit en immunrespons in de mens' dienen we ook het mechanisme van werking te achterhalen. Wederom zal het *in-vitro*-werk hierin beperkend zijn, gezien de eenvoud van de biologische processen in een 1- of 2-celtypesysteem. Om werkingsmechanismen van prebiotica en probiotica te kunnen achterhalen is het essentieel om aan het einde van de dieetinterventie organen te kunnen isoleren voor verder analyses (zoals genexpressie-profilering). Dit is niet mogelijk in humane interventiestudies.

Overwegingen in verband met vermindering:

Zoals hierboven deels beschreven voeren we *in-vitro*-experimenten uit om selecties te maken van prebiotica en probiotica met de meeste potentie voor verbetering van de darmwandintegriteit en ziektebeelden gerelateerd aan metabool syndroom. Door eerst de *in-vitro*-analyses uit te voeren kunnen we de hoeveelheid groepen en het aantal muizen per groep drastische verminderen.

Daarnaast kiezen we ervoor om alleen mannelijke dieren mee te nemen in onze experimenten. Zoals onder kop **B** toegelicht vermindert dit de spreiding van de resultaten, waardoor we kleinere groepen nodig hebben om significante verschillen te detecteren.

Overwegingen in verband met verfijning:

Binnen de proef proberen we de mate van ongerief zo klein mogelijk te houden voor de muizen.

- Het individueel huisvesten van de muizen kan als stressvol worden ervaren. Dit is echter belangrijk binnen ons project om de prebiotica- en probiotica inname nauwkeurig te kunnen meten.
- Om het welzijn van de muizen te bevorderen is er kooiverrijking aanwezig in de vorm van een 'tunnel' om mee te spelen. Tissues als kooiverrijking is in deze proef geen goede optie omdat muizen tijdens het (intensief) versnipperen van de tissues, vezels binnen kunnen krijgen die de resultaten van onze proef kunnen beïnvloeden. Zo is bijvoorbeeld beschreven dat in kooien met tissues een grotere spreiding in immunresponsen werd waargenomen (Pasalic, Lab Anim, 2011). Tissues bevatten cellulose wat sterk lijkt op prebiotica (vallen beiden in de categorie van polysacchariden) wat misschien deze verschillen in immunresponsen zou kunnen verklaren. In het artikel gebruikt voor de powercalculatie werd ook een controlegroep meegenomen die non-prebiotische polysacchariden (cellulose; zoals in tissues) kregen toegediend. Dit verminderde de darmwandpermeabiliteit ook al met ~37% verlaagden t.o.v. placebo (230 µg/ml vs. 360 µg/ml). Ondanks dat polysacchariden ook in lage concentraties in houtsnippen van de bedding kunnen worden gevonden zijn er nog nauwelijks studies uitgevoerd die aantonen of dit een effect heeft op gezondheidsstatus en/of hoeveel bedding er wordt gegeten door de muizen. Een studie die wel een vergelijk maakt tussen een kooi met houtsnipperbedding en een kooi met een stalen bodem laat zien dat dit niet of nauwelijks resulteert in fysieke verschillen tussen de dieren (Leu, J SCI Food Agric, 2014). Bovendien, het verwijderen van de bedding zou een erg groot negatief effect hebben op het welzijn van de dieren, daarom kiezen we er voor de bodembedekking met bedding

(houtsnippers) te behouden.

Voor de muizen worden gedood worden zij verdoofd door middel van isofluraan en samengeperste lucht.

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 orbitapuncties en het doden van de muizen ten behoeve van het isoleren van de organen, zullen de muizen worden verdoofd middels isofluraan en samengeperste lucht (volgens standaardprotocollen van [REDACTED])

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.

Dat deze proeven niet al eerder zijn uitgevoerd zal zorgvuldig worden gevalideerd in een literatuuronderzoek (met behulp van PubMed, Scopus, Quertle en Google Scholar) en in samenspraak met de bedrijven die de prebiotica en probiotica leveren voor de proeven. Bij de bedrijven zal nauwgezet worden geïnformeerd of zij hun prebiotica en probiotica nog niet hebben getest in soortgelijke muizenstudies voor de effecten op darmpermeabiliteit en gerelateerde immuunresponsen.

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

X 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.

Muizen zullen individueel gehuisvest worden in een kooi met vrije toegang tot water en voedsel. We zijn ons er van bewust dat het minder stressvol zou zijn om muizen per 2 te huisvesten, echter is het van belang voor de proef om een duidelijk zicht te hebben op de inname van het dieet en met name prebiotica en probiotica. Het alternatief zou dagelijkse orale gavage zijn, wat ook erg stressvol is of misschien nog wel meer stress induceert dan individuele huisvesting. Zoals hierboven aangegeven zullen we de muizen geen tissues aanbieden omdat het kan leiden tot versturende effecten in de proeven. Verder zullen muizen worden verzorgd volgens standaardprotocollen van [REDACTED]

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?

X 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?

X Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdooving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden

toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Huisvesting:

Dieren worden individueel gehuisvest. Er is echter wel kooiverrijking aanwezig.

Bloedafname:

Dit zal in totaal 5x nodig zijn; 4x vanuit de staart en 1x via een orbitale punctie na het verdoven en voor het offeren.

Drie van de bloedafnames vanuit de staart gebeuren binnen 1 week.

Per staart-bloeding wordt er ~50 µl bloed afgenomen.

Vasten:

Dit zal maximaal 2x nodig zijn waarbij iedere vastenperiode 5 uur duurt.

Gavage (aangenomen gemiddelde van 30 gr/muis):

FITC-dextran 4 kDa of 20 kDa: 0.144 ml 600 mg/kg of 125 mg/ml in PBS Wang, Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, 2001

Niet-levensvatbare salmonella: 0.25-0.3 ml 2-6x10⁶ Salmonella in PBS Nagler, J Immunol, 2009

De toedieningen per gavage zijn in de proef zodanig gepland dat er binnen een tijdsspanne van 14 dagen nooit meer dan 0.3 ml wordt toegediend.

- Het toedienen van niet-levensvatbare salmonella gebeurt 2x en is 15 dagen van elkaar gescheiden
- De FITC-dextran wordt pas toegediend 15 dagen na de 2^{de} niet-levensvatbare salmonella gavage
- Het toedienen van FITC-dextran gebeurt maximaal 2x

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

zie bovenstaande tekst

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

Alle mogelijke maatregelen om schadelijke effecten voor het dierenwelzijn te voorkomen of te verminderen zijn zorgvuldig overwogen. Kooiverrijking zal aanwezig om het welzijn van de muizen te bevorderen en we hebben bewust een proefopzet gekozen om het aantal en de intensiteit van de handelingen te minimaliseren. Dieren zullen worden verdoofd voordat ze worden geofferd.

J. Humane eindpunten

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

X Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Matig

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.

Hiervoor zijn meerdere redenen:

1 Aan het eind van de proef wordt bloed afgenomen voor het bepalen van immuunreactiviteit. Voor de benodigde hoeveelheden dienen de dieren geofferd te worden.

2 De immuunactivatie testen worden ook uitgevoerd met MLNs uit de darm om de kans op immuunmodulatie door orale toedieningen te meten daar het grootst is.

3 Als ondersteunende data aan de barrierefunctie worden er epitheliale cellen uit de darm geschraapt voor verdere genetische analyse

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- 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.	40100	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting DLO	
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>	2	Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. verbeterde cholesterolregulatie

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Mannetjes C57BL/6-(J-strain)-muizen van 7 weken oud zullen individueel worden gehuisvest in een kooi en ze zullen vrije toegang hebben tot water en voer gedurende de gehele proef. Na 1 week op een standaard chowdieet (RMH-B) worden de muizen voor 1 week overgezet op een hoogvetdieet (HFD; 45 kcal% palmolie) met 1.25% cholesterol, zodat de muizen voor de start van de daadwerkelijke dieetinterventie kunnen acclimatiseren/wennen aan het synthetische dieet (uit eerdere experimenten is gebleken dat er betere/betrouwbaardere onderzoeksresultaten kunnen worden behaald door muizen voor de start van de dieetinterventie te laten acclimatiseren aan het synthetische dieet waarbij gebruik wordt gemaakt van gezuiverde grondstoffen). Het gebruik van HFD is noodzakelijk om de algehele cholesterolregulatie te beïnvloeden en cholesterollevels te verhogen. Daarnaast zit in het standaard chowdieet een significante vezelcomponent die in geval van onderzoek naar prebiotica kan zorgen voor versturende effecten.

Na de acclimatisatieperiode (in totaal 2 weken) start de daadwerkelijke dieetinterventie met prebiotica en probiotica. De controlegroep krijgt alleen het HFD, de overige groepen HFD + prebiotica en/of probiotica. Prebiotica zullen voor de interventie door het voer worden gemengd. Voor probiotica kan deze processing nadelige gevolgen hebben voor de integriteit. Vaak worden probiotica daarom (dagelijks) toegediend via orale gavage, dit geeft echter een behoorlijke stress aan de muizen. Als alternatief zullen in deze studie de probiotica worden aangeboden in een hydrogel (een superabsorberende gel die >99% water vasthoudt). Uit eerdere experimenten is gebleken dat muizen de probiotica op deze manier goed innemen zonder nadelige bijeffecten.

Tijdens de dieetinterventie van 8 weken zullen de muizen wekelijks worden gewogen om gewichtstoename op de verschillende dieetinterventies vast te stellen. Na 8 weken dieetinterventie worden de muizen

geofferd. Op dit moment wordt bloed afgenomen via een orbitapunctie en uit de poortader om totaal, HDL- en LDL-cholesterol en triglycerides te meten. Daarnaast worden tijdens de secties dunne en dikke darm geprepareerd voor RNA-isolatie en microarray analyse. Ook worden andere organen (lever, milt) verwijderd en opgeslagen bij -80 graden.

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.

1 Dieetinterventie

Literatuur laat zien dat C57Bl/6J-muizen gedurende HFD-dieetinterventie een significante verhoging laten zien van cholesterol (Williams et al. PLOS 2014, Zu et al. Nutrition & Metabolism 2009). In deze studie willen we onderzoeken of prebiotica en probiotica een positief effect kunnen hebben op de cholesterolregulatie en kunnen leiden tot een verlaging van HFD-geïnduceerde plasmacholesterollevels. Afhankelijk van het gebruik van prebiotica en/of probiotica wordt het door het voer gemengd of in een hydrogel aangeboden aan de muizen zoals in **A** toegelicht.

2 Wegen van de dieren

De muizen worden wekelijks gewogen om de gewichtstoename te monitoren.

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

Om de aantallen groepen te verminderen en de efficiëntie van het gebruik van proefdieren te vergroten testen we de prebiotica en probiotica eerst in *in-vitro*-modellen. Deze modellen bootsten de dunne darm na waar de prebiotica en probiotica een eerste en voornaamste effect zullen hebben. Op basis van deze *in-vitro*-resultaten wordt een keuze gemaakt welke prebiotica en probiotica potentie laten zien om *in-vivo*-cholesterolregulerende effecten te hebben.

Het aantal dieren dat nodig is voor een muizenstudie om de effecten van prebiotica en probiotica te analyseren wordt berekend met een powercalculatie. Het verlagen van plasma cholesterol is gekozen als primaire parameter. Voor de powercalculatie is een recente muizenstudie genomen waarin muizen zijn behandeld met gerst en een verlaging van totaal plasma cholesterol is gevonden van 13-14% (Choi et al. Food Sci. Biotechnol. 2012). Dit lijkt een geringe afname van cholesterol, maar voor een voedingsinterventie (in vergelijking tot een farmaceutische aanpak) is dit een aanzienlijk en significant effect. Waarden vanuit deze studie zijn: onbetrouwbaarheid van de toets = 0,05; onderscheidend vermogen/power = 0,80; gemiddelde controle: 234 mg/dL +/- 25; gemiddelde behandeling: 203 mg/dL +/- 15. Dit geeft aan dat er 11 muizen per groep nodig zijn voor significante resultaten.

Om rekening te houden met uitvallers willen we graag starten met 2 extra dieren. Mochten er geen uitvallers zijn tijdens de acclimatisatieperiode dan zullen deze reservemuizen in de HFD-controlegroep meelopen het einde van de proef.

B. De dieren

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

Mannetjes C57Bl/6-(J-strain)-muizen worden geleverd door Harlan, Nederland.

7 weken oud bij aankomst in het proefdiercentrum. Dieetinterventie start pas als de muizen 9 weken oud zijn, aangezien het wenselijk is dat de groeisprint voorbij is. Er zullen 11 muizen per dieetgroep nodig zijn.

Er is gekozen voor mannetjes C57Bl/6-(J-strain)-muizen, omdat bij vrouwtjesmuizen de kans bestaat dat de oestriscyclus cholesterolregulerende mechanismen (zoals genexpressie) zal beïnvloeden. Het includeren van vrouwtjes zou daardoor leiden tot een groter aantal benodigde muizen per groep en dus het gebruik van meerdere proefdieren. Bovendien zijn ook in voorgaande experimenten (Choi et al. Food Sci Biotechnol. 2012), waarop de huidige studie is gebaseerd, mannetjes C57Bl/6-(J-strain)-muizen gebruikt. Om een goede vergelijking te kunnen maken met deze eerdere experimenten, vinden we het belangrijk om ook nu mannetjes muizen te gebruiken. Ook in de andere proefopzetten binnen dit project worden metingen gedaan waarbij het verschil in geslacht invloed kan hebben op de resultaten. Dus ook voor de totale interpretatie van de resultaten binnen dit project is het belangrijk om overal muizen van hetzelfde geslacht

te gebruiken.

Geschatte aantallen dieren:

Zoals hierboven onder kopje **A** uitgewerkt geeft de powercalculatie aan dat we 11 dieren per groep nodig hebben om significante verschillen te kunnen meten. Met deze hoeveelheden per dier kunnen we vanuit een praktisch oogpunt per proef maximaal 4 groepen tegelijk hanteren: 1 controle en 3 waarbij geïntervenieerd wordt met prebiotica of probiotica. Om alle prebiotica en probiotica te kunnen testen die potentie laten zien voor verbeterde cholesterolregulatie willen we de proef 2 maal uitvoeren. Om rekening te houden met uitvallers willen we elke proef graag starten met 2 extra dieren die ingeval er geen uitvallers zijn meegaan in de controlegroepen. In totaal zou dit betekenen dat we 92 dieren willen gebruiken.

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.

Overwegingen in verband met vervanging:

Deze dierenstudie volgt op *in-vitro*-onderzoek waar we cellijnen en primaire cellen blootstellen aan prebiotica en probiotica. Dit betreft voornamelijk Caco-2 cellen gekweekt in transwells om de darm na te bootsen en de opname en transport van cholesterol en productie van regulatoire eiwitten te meten. Resultaten hiervan kunnen echter slechts een sterke suggestie geven van de te verwachten *in-vivo*-effecten. De gezondheidseffecten die we willen bestuderen vinden de primair plaats in de darm maar de uiteindelijke effecten zijn een resultaat van systemische regulatie. Omdat de complexiteit van deze *in-vivo*-situatie nooit volledig kan worden nagebootst *in vitro* blijft dit een model maar is noodzaak voor *in-vivo*-experimenten.

Voor het uiteindelijke doel: 'het valideren van prebiotica en/of probiotica voor de verbeterde cholesterol regulatie' dienen we ook het mechanisme van werking te achterhalen. Wederom zal het *in-vitro*-werk hierin beperkend zijn, gezien de eenvoud van de biologische processen in een 1-celtypestelsel. Om werkingsmechanismen van prebiotica en probiotica te kunnen achterhalen is het essentieel om aan het einde van de dieetinterventie organen te kunnen isoleren voor verder analyses (zoals genexpressie-profilering). Dit is niet mogelijk in humane interventiestudies.

Overwegingen in verband met vermindering:

Zoals hierboven deels beschreven voeren we *in-vitro*-experimenten uit om selecties te maken van prebiotica en probiotica met de meeste potentie voor verbetering van de cholesterolregulatie. Door eerst de *in-vitro*-analyses uit te voeren kunnen we de hoeveelheid groepen en het aantal muizen per groep drastische verminderen.

Daarnaast kiezen we ervoor om alleen mannetjes dieren mee te nemen in onze experimenten. Zoals onder kop **B** toegelicht vermindert dit de spreiding van de resultaten, waardoor we kleinere groepen nodig hebben om significante verschillen te detecteren.

Overwegingen in verband met verfijning:

Binnen de proef proberen we de mate van ongerief zo klein mogelijk te houden voor de muizen.

- Het individueel huisvesten van de muizen kan als stressvol worden ervaren. Dit is echter belangrijk
- binnen ons project om de prebiotica- en probioticainname nauwkeurig te kunnen meten.

- Om het welzijn van de muizen te bevorderen is er kooiverrijking aanwezig in de vorm van een 'tunnel' om mee te spelen. Tissues als kooiverrijking is in deze proef geen goede optie omdat muizen tijdens het (intensief) versnipperen van de tissues, vezels binnen kunnen krijgen die de resultaten van onze proef zouden kunnen beïnvloeden, aangezien tissues cellulose bevatten wat sterk lijkt op prebiotica (vallen beiden in de categorie van polysacchariden). Voor immunresponsen is dit effect van tissues eerder al beschreven (Pasalic, Lab Anim, 2011). Ondanks dat polysacchariden ook in lage concentraties in houtsnippers van de bedding kunnen worden gevonden zijn er nog nauwelijks studies uitgevoerd die aantonen of dit een effect heeft op gezondheidsstatus en/of hoeveel bedding er wordt gegeten door de muizen. Een studie die wel een vergelijk maakt tussen een kooi met bedding en een kooi met een stalen bodem laat zien dat dit niet of nauwelijks resulteert in fysieke verschillen tussen de dieren (Leu, J SCI Food Agric, 2014). Bovendien, het verwijderen van de bedding zou een erg groot negatief effect hebben op het welzijn van de dieren, daarom kiezen we er voor de bodembedekking met bedding (houtsnippers) te behouden.
- Voor de muizen worden gedood worden zij verdoofd door middel van isofluraan en samengeperste lucht.

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 orbitapuncties en het doden van de muizen ten behoeve van het isoleren van de organen, zullen de muizen worden verdoofd middels isofluraan en samengeperste lucht (volgens standaardprotocollen van [REDACTED])

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.

Dat deze proeven niet al eerder zijn uitgevoerd zal zorgvuldig worden gevalideerd in een literatuuronderzoek (met behulp van PubMed, Scopus, Quertle en Google Scholar) en in samenspraak met de bedrijven die de prebiotica en probiotica leveren voor de proeven. Bij de bedrijven zal nauwgezet worden geïnformeerd of zij hun prebiotica en probiotica nog niet hebben getest in soortgelijke muizenstudies voor de effecten op cholesterolregulatie.

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

X 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.

Muizen zullen individueel gehuisvest worden in een kooi met vrije toegang tot water en voedsel. We zijn ons er van bewust dat het minder stressvol zou zijn om muizen per 2 te huisvesten, echter is het van belang voor de proef om een duidelijk zicht te hebben op de inname van het dieet. Het alternatief zou dagelijkse orale gavage zijn, wat ook erg stressvol is of misschien nog wel meer stress induceert dan individuele huisvesting. Zoals hierboven aangegeven zullen we de muizen geen tissues aanbieden omdat het kan leiden tot versturende effecten in de proeven. Verder zullen muizen worden verzorgd volgens standaardprotocollen van [REDACTED]

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?

X 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?

X 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?

Huisvesting:

Dieren worden individueel gehuisvest wat stress kan opleveren. Er is echter wel kooiverrijking aanwezig.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

zie bovenstaande tekst

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

Alle mogelijke maatregelen om schadelijke effecten voor het dierenwelzijn te voorkomen of te verminderen zijn zorgvuldig overwogen. Kooiverrijking zal aanwezig om het welzijn van de muizen te bevorderen en we hebben bewust een proefopzet gekozen om het aantal handelingen te minimaliseren. Dieren zullen worden verdoofd voordat ze worden geofferd.

J. Humane eindpunten

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

X 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.

Licht

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.

Aan het eind van de proef wordt bloed afgenomen en worden organen verzameld om de effecten van prebiotica en probiotica op cholesterolregulatie in het lichaam goed te kunnen bestuderen.

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.	40100	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting DLO	
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	Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. preventie en vermindering symptomen van metabool syndroom

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Mannelijke C57BL/6-(J-strain)-muizen van 7 weken oud zullen individueel worden gehuisvest in een kooi en ze zullen vrije toegang hebben tot water gedurende de gehele proef en vrije toegang tot voer gedurende de gehele proef behalve tijdens de vastenperiodes. Na 1 week op een standaard chowdieet (RMH-B) worden de muizen voor 1 week overgezet op het laag-vet dieet (LFD; 10 kcal% palmolie), zodat de muizen voor de start van de daadwerkelijke LFD en hoogvetdieet (HFD; 45 kcal% palmolie) dieetinterventie kunnen acclimatiseren/wennen aan de synthetische diëten (uit eerdere experimenten is gebleken dat er betere/betrouwbaardere onderzoeksresultaten kunnen worden behaald door muizen voor de start van de dieetinterventie te laten acclimatiseren aan het synthetische dieet waarbij gebruik wordt gemaakt van gezuiverde grondstoffen). Het gebruik van HFD is noodzakelijk voor het induceren van ziektebeelden gerelateerd aan het metabool syndroom, zoals overgewicht, glucose-intolerantie en leververvetting en dus voor het bestuderen van de effecten van prebiotica en probiotica op (de ontwikkeling) van deze hoogvet-geïnduceerde ziektebeelden. Uit eerdere proeven is gebleken dat deze ziektebeelden zich ontwikkelen gedurende een 8-weekse HFD-dieetinterventie [redacted]. Een synthetisch HFD-dieet is nodig omdat een standaard chowdieet een significante vezelcomponent bevat die in geval van onderzoek naar prebiotica kan zorgen voor versturende effecten.

Na de acclimatisatieperiode (in totaal 2 weken) start de daadwerkelijke dieetinterventie met prebiotica en/of probiotica. De controlegroepen krijgen alleen het LFD (controle voor HFD-geïnduceerde symptomen van het metabool syndroom zoals overgewicht, glucose-intolerantie en leververvetting) of HFD (controle voor de prebiotica- en/of probioticaeffecten), de overige groepen krijgen HFD + prebiotica en/of probiotica. Om de effecten van verschillende prebiotica en probiotica op de ontwikkeling van het metabool syndroom te

bestuderen zullen deze voedingscomponenten worden gecombineerd met het HFD. Prebiotica zullen voor de interventie door het voer worden gemengd. Voor probiotica kan deze processing nadelige gevolgen hebben voor de integriteit. Vaak worden probiotica daarom (dagelijks) toegediend via orale gavage, dit geeft echter een behoorlijke stress aan de muizen. Als alternatief zullen in deze studie de probiotica worden aangeboden in een hydrogel (een superabsorberende gel die >99% water vasthoudt). Uit eerdere experimenten is gebleken dat muizen de probiotica op deze manier goed innemen zonder nadelige bijeffecten.

Tijdens de dieetinterventie van 8 weken zullen de muizen wekelijks worden gewogen om gewichtstoename op de verschillende dieetinterventies vast te stellen. Na 6 weken dieetinterventie wordt een barrièrefunctietest uitgevoerd, waarbij na O/N vasten FITC-Dextran wordt toegediend aan de muizen via orale gavage. Op 1 uur na gavage wordt via een staartbloeding bloed verzameld voor de analyse van FITC-Dextran in bloed. Na 7 weken dieetinterventie zal een orale glucosetolerantietest worden uitgevoerd. Bij deze test zal glucose (200-500 µl) via gavage worden toegediend, waarna via staartbloeding bloed zal worden verzameld voor de analyse van glucoseniveaus. Voor deze tolerantietest zal 7 keer een druppel bloed (~20µl) worden verzameld binnen 150 minuten. Na 8 weken dieetinterventie worden de muizen geofferd, zal bloed worden verzameld via een orbitapunctie en aansluitend zullen organen (darm, lever, vetweefsel, milt, hersenen) worden verwijderd. Alle samples zullen direct na isolatie worden opgeslagen bij -80.

De primaire uitkomstparameters zijn gewicht(toename), barrièrefunctie darm, glucose intolerantie en leververvetting. De laatste zal worden bepaald door middel van histologie nadat de muizen zijn geofferd.

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.

1 Dieetinterventie

Uit eerdere experimenten (van de afdeling ██████████ Wageningen UR; ██████████ ██████████) is gebleken dat C57Bl/6J-muizen gedurende 7-8 weken HFD-interventie, overgewicht, glucose-intolerantie en leververvetting ontwikkelen. Karakteristiekken die passen bij het metabool syndroom. HFD-geïnduceerde veranderingen in barrièrefunctie van de darm is een relatief nieuwe parameter die we willen bestuderen in het kader van HFD-geïnduceerde ontwikkeling van metabool syndroom. Verder willen we in onze studies nu met name de effecten van prebiotica en probiotica bestuderen op deze parameters gelinkt aan HFD-geïnduceerde ontwikkeling van het metabool syndroom. Afhankelijk van het gebruik van prebiotica en/of probiotica wordt het door het voer gemengd of in een hydrogel aangeboden aan de muizen zoals in **A** toegelicht.

2 Wegen van de dieren

De muizen worden wekelijks gewogen om de gewichtstoename te monitoren.

3 Orale glucosetolerantietest

Na 6 uur vasten in de ochtend zal glucose via gavage worden toegediend, waarna via staartbloeding bloed zal worden verzameld voor de analyse van glucose niveaus. Voor deze tolerantietest zal 7 keer een druppel (~20 µl) bloed worden verzameld binnen 150 minuten.

4 Barrièrefunctie test

Na 4 uur vasten wordt FITC-dextran via gavage toegediend en 1 uur later bloed afgenomen via een staartbloeding.

- Toediening dient per gavage plaats te vinden om er zeker van te zijn dat exacte hoeveelheden worden toegediend en groepen met elkaar te vergelijken zijn. Het is voor FITC-dextran noodzakelijk om te kunnen bepalen hoeveel er de barrière passeert (in % van toegediende hoeveelheden).

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

Om de aantallen groepen te verminderen en de efficiëntie van het gebruik van proefdieren te vergroten testen we de prebiotica en probiotica eerste in *in-vitro*-modellen. Deze modellen bootsten de dunne darm en onderliggende immuuncellen na waar de prebiotica en probiotica een eerste en voornaamste effect zullen

hebben. Op basis van resultaten van het stimuleren van deze cellijnen wordt een keuze gemaakt welke prebiotica en probiotica potentie laten zien om *in vivo* de symptomen van metabool syndroom te verminderen.

Het aantal dieren dat nodig is voor een muizenstudie om de effecten van prebiotica en probiotica te analyseren wordt berekend met een powercalculatie. De glucosetoleratietest is gekozen als primaire uitkomstmaat. Powerberekening op basis van eerder gevonden effecten van vezels op glucose/insulinetolerantietest (Isken et al. J Nutr. Biochem. 2010) geeft aan dat er 10 muizen per groep nodig zijn voor significante resultaten (onbetrouwbaarheid van de toets =0,05; onderscheidend vermogen/power =0,80; werkelijkheidsverschil =13.3%; verwachte standaardafwijking =14.7%). Voor een voedingsinterventie die vaak een minder sterk effect zal geven dan farmaceutische behandelingen zijn deze te verwachten effecten van vezels op glucose/insulinetolerantie een aanzienlijke en significante verbetering. Bovendien geven voedingsinterventies waar veel minder bijwerkingen dan medicijnen en kunnen ze voor langere periodes worden toegepast.

Aangezien de C57Bl/6J-muizen elders worden besteld (Harlan), zouden we graag 2 extra muizen bestellen in verband met mogelijke 'drop-outs' (door transport/acclimatisatie). Mochten er geen drop-outs zijn tijdens de acclimatisatieperiode dan zullen deze reservemuizen in de LFD controlegroep meelopen het einde van de proef.

B. De dieren

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

Mannelijke C57Bl/6-(J-strain)-muizen worden geleverd door Harlan, Nederland.

7 weken oud bij aankomst in het proefdiercentrum. Dieetinterventie start pas als de muizen 9 weken oud zijn, aangezien het wenselijk is dat de groeispurt voorbij is. Er zullen 10 muizen per dieetgroep nodig zijn.

Er is gekozen voor mannelijke C57Bl/6-(J-strain)-muizen, omdat bij vrouwelijke muizen de kans bestaat dat de oestriscyclus de ontwikkeling van metabool syndroom en darmspecieke mechanismen (zoals genexpressie) zal beïnvloeden. Het includeren van vrouwelijke dieren zou daardoor leiden tot een groter aantal benodigde muizen per groep en dus het gebruik van meerdere proefdieren. Bovendien zijn ook in voorgaande experimenten [REDACTED], waarop de huidige studie is gebaseerd, mannelijke C57Bl/6-(J-strain)-muizen gebruikt. Om een goede vergelijking te kunnen maken met deze eerdere experimenten, vinden we het belangrijk om ook nu mannelijke muizen te gebruiken. Ook in de andere proefopzetten binnen dit project worden metingen gedaan waarbij het verschil in geslacht invloed kan hebben op de resultaten. Dus ook voor de totale interpretatie van de resultaten binnen dit project is het belangrijk om overal muizen van hetzelfde geslacht te gebruiken.

Geschatte aantallen dieren:

Zoals hierboven onder kopje **A** uitgewerkt geeft de powercalculatie aan dat we 10 dieren per groep nodig hebben om significante verschillen te kunnen meten. Met deze aantallen per groep kunnen we vanuit een praktisch oogpunt per proef maximaal 4 groepen tegelijk hanteren: 2 controlegroepen (LFD en HFD) en 2 groepen HFD waarbij geïntervenieerd wordt met prebiotica en/of probiotica. Om alle prebiotica en probiotica te kunnen testen die potentie laten zien voor het verminderen van symptomen van metabool syndroom willen we de proef 2 maal uitvoeren. Om rekening te houden met uitvallers willen we elke proef graag starten met 2 extra dieren. In totaal zou dit betekenen dat we 82 ($2 \times 4 \times 10 + 2$) dieren willen gebruiken.

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.

Overwegingen in verband met vervanging:

Deze dierenstudie volgt op *in-vitro*-onderzoek waar we cellijnen blootstellen aan prebiotica en probiotica. Dit betreft voornamelijk Caco-2 cellen gekweekt in transwells om de dunne of de dikke darm na te bootsen. Resultaten hiervan kunnen echter slechts een sterke suggestie geven voor de te verwachten *in-vivo*-effecten. De gezondheidseffecten die we willen bestuderen vinden primair plaats in de darm maar de uiteindelijke effecten zijn een resultaat van systemische regulatie. Omdat de complexiteit van deze *in-vivo*-situatie nooit volledig kan worden nagebootst *in vitro* blijft dit een model maar is er een noodzaak voor *in-vivo*-experimenten.

Voor het uiteindelijke doel: 'het valideren van prebiotica en/of probiotica voor de het verminderen van symptomen van metabool syndroom' dienen we ook het mechanisme van werking te achterhalen. Wederom zal het *in-vitro*-werk hierin beperkend zijn, gezien de eenvoud van de biologische processen in een 1-celtype systeem. Om werkingsmechanismen van prebiotica en probiotica te kunnen achterhalen is het essentieel om aan het einde van de dieetinterventie organen te kunnen isoleren voor verder analyses (zoals genexpressie-profiling). Dit is niet mogelijk in humane interventie studies.

Overwegingen in verband met vermindering:

Zoals hierboven deels beschreven voeren we *in-vitro*-experimenten uit om selecties te maken van prebiotica en probiotica met de meeste potentie voor verbetering van de darmwandintegriteit en ziektebeelden gerelateerd aan metabool syndroom. Door eerst de *in-vitro*-analyses uit te voeren kunnen we de hoeveelheid groepen en het aantal muizen per groep drastisch verminderen.

Daarnaast kiezen we ervoor om alleen mannelijke dieren mee te nemen in onze experimenten. Zoals onder kop **B** toegelicht vermindert dit de spreiding van de resultaten, waardoor we kleinere groepen nodig hebben om significante verschillen te detecteren.

Overwegingen in verband met verfijning:

Binnen de proef proberen we de mate van ongerief zo klein mogelijk te houden voor de muizen.

- Het individueel huisvesten van de muizen kan als stressvol worden ervaren. Dit is echter belangrijk binnen ons project om de prebiotica- en probiotica-inname nauwkeurig te kunnen meten.
- Om het welzijn van de muizen te bevorderen is er kooiverrijking aanwezig in de vorm van een 'tunnel' om mee te spelen. Tissues als kooiverrijking is in deze proef geen goede optie omdat muizen tijdens het (intensief) versnipperen van de tissues, vezels binnen kunnen krijgen die de resultaten van onze proef zouden kunnen beïnvloeden, aangezien tissues cellulose bevatten wat sterk lijkt op prebiotica (vallen beiden in de categorie van polysacchariden). Voor immunresponsen is dit effect van tissues eerder al beschreven (Pasalic, Lab Anim, 2011). Ondanks dat polysacchariden ook in lage concentraties in houtsnippers van de bedding kunnen worden gevonden zijn er nog nauwelijks studies uitgevoerd die aantonen of dit een effect heeft op gezondheidsstatus en/of hoeveel bedding er wordt gegeten door de muizen. Een studie die wel een vergelijking maakt tussen een kooi met bedding en een kooi met een stalen bodem laat zien dat dit niet of nauwelijks resulteert in fysieke verschillen tussen de dieren (Leu, J SCI Food Agric, 2014). Bovendien, het verwijderen van de bedding zou een erg groot negatief effect hebben op het welzijn van de dieren, daarom kiezen we er voor de bodembedekking met bedding (houtsnippers) te behouden.
- Voor de muizen worden gedood worden zij verdoofd door middel van isofluraan en samengeperste lucht.

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 orbitapuncties en het doden van de muizen ten behoeve van het isoleren van de organen, zullen de muizen worden verdoofd middels isofluraan en samengeperste lucht (volgens standaardprotocollen van het CKP).

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.

Dat deze proeven niet al eerder zijn uitgevoerd zal zorgvuldig worden gevalideerd in een literatuuronderzoek (met behulp van PubMed, Scopus, Quertle en Google Scholar) en in samenspraak met de bedrijven die de prebiotica en probiotica leveren voor de proeven. Bij de bedrijven zal nauwgezet worden geïnformeerd of zij hun prebiotica en probiotica nog niet hebben getest in soortgelijke muizenstudies voor de effecten op ziektebeelden die gerelateerd zijn aan het metabool syndroom.

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

X 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.

Muizen zullen individueel gehuisvest worden in een kooi met vrije toegang tot water en voedsel. We zijn ons er van bewust dat het minder stressvol zou zijn om muizen per 2 te huisvesten, echter is het van belang voor de proef om een duidelijk zicht te hebben op de inname van het dieet en met name prebiotica en probiotica. Het alternatief zou dagelijkse orale gavage zijn, wat ook erg stressvol is of misschien nog wel meer stress induceert dan individuele huisvesting. Zoals hierboven aangegeven zullen we de muizen geen tissues aanbieden omdat het kan leiden tot versturende effecten in de proeven. Verder zullen muizen worden verzorgd volgens standaardprotocollen van [REDACTED]

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?

X 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?

X 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?

Huisvesting:

Dieren worden individueel gehuisvest. Er is echter wel kooiverrijking aanwezig.

Bloedafname:

Dit zal in totaal 8x nodig zijn en alle keren via een staartbloeding. Van de 8 bloedafnames vindt 7x binnen 150 minuten plaats voor de glucosetolerantietest. De 8x vindt 1 week later plaats.

Per staartbloeding wordt er 20ul bloed afgenomen.

Vasten:

Dit is 2x nodig. Voor de glucosetolerantietest zal 6 uur worden gevast, voor de darmpermeabiliteitstest zal het vasten 4 uur duren. Het vasten is in 2 opeenvolgende weken gepland.

Orale gavage (aangenomen gemiddelde van 30 gr/muis):

FITC-dextran: 0.072 ml 600 mg/kg of 250 mg/ml in PBS

Glucose: 0.2-0.5 ml 20% glucoseoplossing in PBS

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Zie bovenstaande tekst

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

Alle mogelijke maatregelen om schadelijke effecten voor het dierenwelzijn te voorkomen of te verminderen zijn zorgvuldig overwogen. Kooiverrijking zal aanwezig om het welzijn van de muizen te bevorderen en we hebben bewust een proefopzet gekozen om het aantal en de intensiteit van de handelingen te minimaliseren. Dieren zullen worden verdoofd voordat ze worden geofferd.

J. Humane eindpunten

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

X Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Matig

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.

Aan het eind van de proef wordt bloed afgenomen en worden organen verzameld om de effecten van prebiotica en probiotica op karakteristieken van het metabool syndroom (zoals plasma cholesterolwaarden, triglyceriden levels en andere plasma biomarkers, vervetting van de lever, genexpressie darm/lever) goed te kunnen bestuderen.

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.

XJa

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer AVD401002015152
2. Titel van het project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica"
3. Titel van de niet-technische samenvatting "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica".
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam: DEC Wageningen Universiteit
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC 04-06-2015
 - aanvraag compleet: ja
 - in vergadering besproken: 15-06-2015
 - termijnonderbreking(en) van 18-06-2015 tot 25-06-2015
 - aanpassing aanvraag: 25-06-2015
 - advies aan CCD: 30-06-2015
7. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 18-06-2015
 - Strekking van de vragen
 - De DEC heeft vragen gesteld m.b.t.:

- De achtergrond, m.n. een nadere aanduiding van de begrippen darmgezondheid, darmintegriteit en darmpermeabiliteit en hun onderlinge samenhang;
- Nadere toelichting op de keuze voor mannelijke dieren/ de invloed van de oestriscyclus op de therapeutische werking van de toe te dienen stoffen;
- Nadere onderbouwing van de keuze voor de stam/ diersoort, mede in relatie tot de vertaling naar de humane situatie;
- Motivatie voor de toediening van een hoogvetdieet en de duur van de toediening van het dieet te motiveren;
- De relevantie van een daling van plasmalevels met 75% voor mensen (statistische overwegingen);
- Een uitgebreidere weergave van geraadpleegde bronnen/ databases ter voorkoming herhaling;
- Nadere toelichting op de overwegingen m.b.t. het gebruik van bedding i.p.v. tissues;
- Enkele redactionele opmerkingen, zowel in de bijlagen als in de niet-technische samenvatting;

Datum antwoord: 25-06-2015

- Strekking van het (de) antwoord(en)

De onderzoeker heeft alle vragen van de DEC gehonoreerd en de antwoorden verwerkt in de nieuwe projectaanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een reëel belang. Zij verwacht dat het project bij zal kunnen dragen aan de preventie en/of behandeling van diverse ziektes/aandoeningen waar veel mensen aan leiden en de kwaliteit van leven van deze mensen kan verbeteren. Het feit dat de onderzochte voedselcomponenten laagdrempelig kunnen worden toegepast draagt hieraan bij. De onderzochte stoffen vormen een aanvulling op reeds bestaande en kunnen bijdragen aan een bredere en meer gerichte bediening van de mens, omdat de gezondheidsstatus en de specifieke reactie op prebiotica en probiotica aanzienlijk kan verschillen tussen mensen.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het project wordt uitgevoerd op basis van een in-vitro-voorselectie, m.b.v. gevalideerde proefopzetten, door personen die beschikken over relevante kennis en expertise op het gebied van pre- en probiotica.

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: De muizen zullen individueel gehuisvest worden in een kooi met bedding en kooiverrijking en vrije toegang tot water en voedsel. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.

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

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Voor het toetsen van gezondheidsbevorderende effecten in een compleet systeem en het achterhalen van de onderliggende werkingsmechanismen zijn muizenstudies nodig. Voor dit laatste is het verzamelen van organen noodzakelijk.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Door een prescreening in celweekmodellen wordt een voorselectie gemaakt van prebiotica en probiotica, waardoor het aantal groepen binnen de dierstudies en het aantal benodigde muizen per groep kan worden beperkt. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende (negatieve) milieueffecten.

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

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren, de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project voordelen opleveren, m.n. voor de mens. Het project heeft enerzijds een fundamenteel karakter (analyse van het werkingsmechanisme van pre- en probiotica), anderzijds is het toepassingsgericht en in potentie humaan relevant (het identificeren en valideren van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en/of probiotica met betrekking tot diverse, veel voorkomende ziekten/ ziektebeelden).

30 juni 2015

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



WAGENINGEN UR
For quality of life

Inkooporder/Purchase order

Pagina 1 van 1

CENTRALE COMMISSIE DIERPROEVEN

DEN HAAG

Nederland

Datum/Date 19-6-2015

Contact

Ordernr./Purchase order no. *

Telefoon/Telephone

Klantnr./Customer no.

E-mail

Raamovereenkomst/Framework contract

BTW-nummer/VAT number

KvK nr./CoC no.

- * Inkoopordernummer op pakbon, indien van toepassing, en factuur vermelden. Facturen zonder inkoopordernummer worden niet in behandeling genomen.
- * Do quote the purchase order number on packing list, if applicable, and invoice. Invoices lacking purchase order number will not be considered.
- * Facturatie: Wageningen UR accepteert uitsluitend elektronische facturen via het platform van [redacted] Voor informatie en registratie zie [redacted]
- * Invoicing: Wageningen UR will only accept electronic invoices sent through the [redacted] platform. For information and registration please go to [redacted]

Artikelnr/ Stock no	Omschrijving product / dienst/ Product / service description	Eenheid/ Unit	Aantal/ Amount	Prijs per eenheid/ Price per unit	Totaal/ Total price	Leverdatum/ Delivery date
1	Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica [redacted]	stuk 1,00	1	741,00 EUR	741,00 EUR	19-06-2015

Totaalbedrag excl. BTW/Total amount due excl. tax	741,00 EUR
--	-------------------

Afleveradres/Delivery address	Factuuradres/Invoice address
Wageningen UR, [redacted] t.a.v. [redacted] [redacted] Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen Nederland	Wageningen UR [redacted] t.a.v. [redacted] Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen Nederland E-invoice platform [redacted] Of als PDF-bestand naar [redacted]

Voor deze inkooporder gelden de volgende opmerkingen./The following remarks apply to this order.

Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica [redacted]

Met vriendelijke groet,/Kind regards,

Op de *dienst* zijn van toepassing: de Algemene Rijksvoorwaarden voor Diensten (ARVODI) 2011. Klik [hier](#) voor de ARVODI 2011.

Op het *product* zijn van toepassing: de Algemene Rijksvoorwaarden voor Producten (ARIV) 2011. Klik [hier](#) voor de ARIV 2011.

Op het *werk* zijn van toepassing: de Uniforme Administratieve Voorwaarden voor de uitvoering van werken en van technische installatiewerken 2012 (UAV 2012), behoudens indien opdrachtgever schriftelijk andere algemene voorwaarden of een rangregeling van toepassing verklaart, bijvoorbeeld in een offerte-uitvraag, aanbesteding, overeenkomst e.d..

Opdrachtgever/koper wijst (leverings- en betalings) voorwaarden van opdrachtnemer, zijn onderaannemers, leveranciers, fabrikanten e.d. wat betreft deze opdracht en nadere opdrachten die daar uit voortvloeien, uitdrukkelijk van de hand.

General Government Terms and Conditions for Public Service Contracts (ARVODI) 2011 are applicable to purchases of services. Click [here](#) for the ARVODI 2011.

The General Government Purchasing Conditions (ARIV) 2011 are applicable to purchases of products. Click [here](#) for the ARIV 2011.

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 6 juli 2015 13:47
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: factuur WUR869884
Bijlagen: Factuur WUR 401002015152.pdf

Goedemiddag heer/mevrouw,

Hierbij ontvangt u een factuur WUR869884 voor een vergunningaanvraag AVD401002015152.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
[REDACTED]

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002015152

Bijlagen

2

Datum 07-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 6 juli 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002015152. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. 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: 40100

Naam instelling of organisatie: Stg DLO

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 9098104

Straat en huisnummer:

Postbus:

Postcode en plaats: WAGENINGEN

IBAN: NL10RABO0397066465

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie: Senior Scientist

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Senior Scientist
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 september 2015
Geplande einddatum: 1 september 2020
Titel project: Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica
Titel niet-technische samenvatting: Bepalen van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica
Naam DEC: DEC WU
Postadres DEC: [REDACTED] Wageningen
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Wageningen

Datum:

2 juli 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002015152

Bijlagen

2

Datum 07-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 7 juli 2015

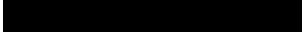
Vervaldatum: 6 augustus 2015

Factuurnummer: 201570152

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002015152	€ 741,00

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



Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 20 juli 2015 13:29
Aan: 
Onderwerp: aanvullende vragen aan DEC Wageningen betreffend project AVD401002015152

Geachte leden van de DEC Wageningen,


Op 6 juli 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica" met aanvraagnummer 401002015152 waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. In het advies en de aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. De beslissing van de CCD om tot vergunning van een project over te gaan is gebaseerd op een gemotiveerd advies van een DEC. Voor de CCD is een aantal aspecten uit de projectaanvraag betreffende de doelstelling en haalbaarheid van het project nog onduidelijk, en is onduidelijk of deze aspecten zijn besproken bij de afweging door de DEC. Om tot een goede afweging te komen heeft de CCD nog antwoord op een aantal vragen nodig. Voordat deze aan de aanvrager/ onderzoeker worden gesteld zou de CCD graag van u horen of de DEC in de vergadering deze aspecten heeft besproken en wanneer dit het geval is, of u uw advies kunt aanvullen op deze punten.

Het project beoogt als doelstelling gezondheidsbevorderende effecten van pre- en probiotica te identificeren en het achterliggende werkingsmechanisme te achterhalen. In de aangevraagde dierproeven worden robuuste uitleesparameters beschreven, die mogelijk wel gezondheidsbevorderende effecten kunnen laten zien, maar die geen informatie geven over het mogelijke werkingsmechanisme. Uit de beschrijving van de ex-vivo analyses wordt niet duidelijk welke mogelijke werkingsmechanismen nader worden onderzocht, hoe deze worden onderzocht en of het uitvoeren van deze analyses afhankelijk is van de uitkomsten van de (robuuste) uitleesparameters in vivo. Omdat (gezondheids)effecten door het toedienen van pre- en probiotica mogelijk subtiel zijn hoort de CCD graag de motivering van de DEC over criteria op basis waarvan aanvullende analyses worden gedaan omdat dit mogelijk consequenties heeft voor het behalen van deze doelstelling.

In het projectvoorstel wordt beschreven dat de dierproeven niet in een vaste volgorde worden uitgevoerd. Uit het projectvoorstel wordt niet duidelijk of de pre- en probiotica welke worden geïdentificeerd uit het in vitro onderzoek mogelijk op meerdere van de geselecteerde parameters tegelijkertijd een effect zouden kunnen hebben. In geval meerdere gezondheidseffecten worden verwacht zou naar de mening van de CCD een gefaseerde inzet van proefdieren mogelijk zijn, waarbij go/no go criteria geformuleerd kunnen worden op basis waarvan een volgende dierproef wordt gestart. Heeft de DEC hierover in de vergadering gesproken?

De aanvrager kiest voor de categorie: translationeel of toegepast onderzoek. Uit de doelstellingen van het project namelijk het identificeren en valideren van gezondheidsbevorderende effecten en werkingsmechanismen zou, naar de mening van de CCD dit project in de categorie fundamenteel onderzoek behoren. Kan de DEC de keuze voor de categorie nader motiveren?

Voor een tijdige afhandeling van deze projectaanvraag zouden we graag uiterlijk donderdag 16 juli van u vernemen of deze vragen in de DEC vergadering behandeld zijn. Na donderdag zullen wij de aanvrager / onderzoeker benaderen.

Met vriendelijke groet, 

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 22 juli 2015 13:06
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: FW: aanvullende informatie gevraagd AVD401002015152

Geachte mevrouw [REDACTED]

De CCD had uw DEC op 20 juli om aanvullende informatie om onderstaand dossier gevraagd. Voor een goede voortgang hebben wij parallel de vragen aan de onderzoeker gestuurd. U geeft aan vanaf 3 augustus weer beschikbaar te zijn, indien mogelijk hoort de CCD graag de visie en toelichting van de DEC op deze projectaanvraag en als het mogelijk is wil ik u vragen deze informatie voor vrijdag 7 augustus 2015 aan ons toe te sturen,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 22 juli 2015 13:01
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie gevraagd AVD401002015152

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft een project aanvraag ter behandeling gekregen waarvan u de verantwoordelijk onderzoeker bent. Het betreft het project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica" met aanvraagnummer 401002015152.

Bij de beoordeling van deze aanvraag heeft de CCD nog een aantal vragen waarop wij u om nadere toelichting willen vragen. Conform afspraak hebben wij deze vragen eerst aan de DEC WUR voorgelegd, die een advies over dit project aan de CCD heeft uitgebracht, omdat dit wellicht ook al bij de behandeling van deze aanvraag in de DEC vergadering is besproken. Omdat wij door vakantie van de DEC secretaris nog op dit antwoord moeten wachten stel ik deze vragen ook vast aan u.

De CCD is voornemens dit dossier in de eerstvolgende vergadering te behandelen en daarom willen wij u vragen om voor woensdag 28 Juli uw toelichting aan ons op te sturen.

Kunt u de volgende punten nader toelichten?

Het project beoogt als doelstelling gezondheidsbevorderende effecten van pre- en probiotica te identificeren en het achterliggende werkingsmechanisme te achterhalen. In de aangevraagde dierproeven worden robuuste uitleesparameters beschreven, die mogelijk wel gezondheidsbevorderende effecten kunnen laten zien, maar die geen informatie geven over het mogelijke werkingsmechanisme. Uit de beschrijving van de ex-vivo analyses wordt niet duidelijk welke mogelijke werkingsmechanismen nader worden onderzocht, hoe deze worden onderzocht en of het uitvoeren van deze analyses afhankelijk is van de uitkomsten van de (robuuste) uitleesparameters in vivo. Omdat (gezondheids)effecten door het toedienen van pre- en probiotica mogelijk subtiel zijn hoort de CCD graag de motivering over criteria op basis waarvan aanvullende analyses worden gedaan omdat dit mogelijk consequenties heeft voor het behalen van deze doelstelling.

In het projectvoorstel wordt beschreven dat de dierproeven niet in een vaste volgorde worden uitgevoerd. Uit het projectvoorstel wordt niet duidelijk of de pre- en probiotica welke worden geïdentificeerd uit het in vitro onderzoek mogelijk op meerdere van de geselecteerde parameters tegelijkertijd een effect zouden kunnen hebben. In geval meerdere gezondheidseffecten worden verwacht zou een gefaseerde inzet van proefdieren mogelijk zijn, waarbij go/no go criteria geformuleerd kunnen worden op basis waarvan een volgende dierproef wordt gestart. Kunt u op dit punt een meer gedetailleerde onderzoeksstrategie beschrijven?

De aanvrager kiest voor de categorie: translationeel of toegepast onderzoek. Uit de doelstellingen van het project namelijk het identificeren en valideren van gezondheidsbevorderende effecten en werkingsmechanismen zou dit project in de categorie fundamenteel onderzoek behoren. Kunt de keuze voor de categorie nader motiveren?

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

[REDACTED]

Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: aanvullende informatie gevraagd AVD401002015152

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 23 juli 2015 12:10
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: aanvullende informatie gevraagd AVD401002015152

Beste [REDACTED]

Bij deze mijn respons, zie in onderstaande mail. 202.
Vanaf morgen ben ik voor 3 weken niet aanwezig ivm vakantie. Mochten er nog vragen zijn kun je evt [REDACTED] (ook CC) benaderen, hij is volledig op de hoogte van het protocol.

Groeten,
[REDACTED]

From: [REDACTED]
Sent: donderdag 23 juli 2015 10:24
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: FW: aanvullende informatie gevraagd AVD401002015152


Beste [REDACTED]

Hierbij het verzoek om de gevraagde informatie op te stellen en zo spoedig mogelijk (vóór 28/7) naar mij op te sturen. Ik zal ervoor zorgen dat de reactie wordt verstuurd naar de CCD.

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Wageningen
[REDACTED] Wageningen

T
F
E

 Please consider your environmental responsibility
before printing this e-mail.

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van het Facilitair Bedrijf, Veiligheid & Milieu is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: woensdag 22 juli 2015 13:01

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: aanvullende Informatie gevraagd AVD401002015152

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft een project aanvraag ter behandeling gekregen waarvan u de verantwoordelijk onderzoeker bent. Het betreft het project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica" met aanvraagnummer 401002015152.

Bij de beoordeling van deze aanvraag heeft de CCD nog een aantal vragen waarop wij u om nadere toelichting willen vragen. Conform afspraak hebben wij deze vragen eerst aan de DEC WUR voorgelegd, die een advies over dit project aan de CCD heeft uitgebracht, omdat dit wellicht ook al bij de behandeling van deze aanvraag in de DEC vergadering is besproken. Omdat wij door vakantie van de DEC secretaris nog op dit antwoord moeten wachten stel ik deze vragen ook vast aan u.

De CCD is voornemens dit dossier in de eerstvolgende vergadering te behandelen en daarom willen wij u vragen om voor woensdag 28 Juli uw toelichting aan ons op te sturen.

Kunt u de volgende punten nader toelichten?

Het project beoogt als doelstelling gezondheidsbevorderende effecten van pre- en probiotica te identificeren en het achterliggende werkingsmechanisme te achterhalen. In de aangevraagde dierproeven worden robuuste uitleesparameters beschreven, die mogelijk wel gezondheidsbevorderende effecten kunnen laten zien, maar die geen informatie geven over het mogelijke werkingsmechanisme. Uit de beschrijving van de ex-vivo analyses wordt niet duidelijk welke mogelijke werkingsmechanismen nader worden onderzocht, hoe deze worden onderzocht en of het uitvoeren van deze analyses afhankelijk is van de uitkomsten van de (robuuste) uitleesparameters in vivo.

Omdat (gezondheids)effecten door het toedienen van pre- en probiotica mogelijk subtiel zijn hoort de CCD graag de motivering over criteria op basis waarvan aanvullende analyses worden gedaan omdat dit mogelijk consequenties heeft voor het behalen van deze doelstelling.

Voor het achterhalen van werkingsmechanismen (op cellulair niveau) worden met name genexpressieanalyses uitgevoerd op weefsels die tijdens de secties worden verzameld, zoals darm, lever, vetweefsel, etc. Deze analyses vinden dus pas plaats na het beëindigen van de proef. Binnen onze onderzoeksafdeling is er veel expertise met genexpressieanalyses door middel van microarrays, RNAseq en qPCR, en ook in de *in vitro* experimenten die vooral gaan aan de muizenstudies wordt genexpressie uitgebreid bestudeerd. Aansluitend kunnen de weefsels nog worden ingezet voor eiwitanalyses door middel van immuunhistochemie en Western blotting. Op deze manier hopen we de betrokken genen/eiwitten en biologische processen (met name gericht op darmbarrièrefunctie (tight junctions), cholesterol/vet/suiker metabolisme, immuun-gerelateerde processen) beter in beeld te kunnen brengen. Ook worden er *ex vivo* experimenten gedaan, waarbij bloed na afname extra wordt gestimuleerd met immuun-stimulatoire moleculen, waardoor potentiële effecten op immuunrespons beter gemeten kunnen worden. De primaire (robuuste) uitleesparameters zijn dus belangrijk om de systemische gezondheidseffecten te valideren, maar met name na beëindigen van de proef worden de werkingsmechanismen verder onderzocht.

In het projectvoorstel wordt beschreven dat de dierproeven niet in een vaste volgorde worden uitgevoerd. Uit het projectvoorstel wordt niet duidelijk of de pre- en probiotica welke worden geïdentificeerd uit het *in vitro* onderzoek mogelijk op meerdere van de geselecteerde parameters tegelijkertijd een effect zouden kunnen hebben. In geval meerdere gezondheidseffecten worden verwacht zou een gefaseerde inzet van proefdieren mogelijk zijn, waarbij go/no go criteria geformuleerd kunnen worden op basis waarvan een volgende dierproef wordt gestart. Kunt u op dit punt een meer gedetailleerde onderzoeksstrategie beschrijven?

In principe wordt alleen het meest veelbelovende effect dat is gevonden in het *in vitro* onderzoek verder bestudeerd en gevalideerd in de muizenstudies. Mochten er van een pre- en/of probiotica toch echt meerdere interessante gezondheidsbevorderende effecten worden gevonden in de *in vitro* proeven dan hangt de volgorde van de muizenstudies af van welke muizenstudie op dat moment het meest efficiënt ingezet kan worden. We proberen namelijk zoveel mogelijk pre- en/of probiotica mee te nemen in 1 muizenstudie, tot het maximaal aantal groepen dat mogelijk is per experiment. Dit om elke muizenstudie zo optimaal mogelijk te benutten (zodat uiteindelijk zo weinig mogelijk dieren gebruikt hoeven te worden). Dit zal dus mede de volgorde bepalen van het valideren van (meerdere)

gezondheidsbevorderende effecten. Stel dat de eerste muizenstudie geen effect laat zien van het pre- en/of probiotica dan is dat geen reden om de volgende muizenstudie voor het valideren van een ander gezondheidsbevorderende effect niet uit te voeren, omdat het nog steeds heel goed mogelijk is dat dit 2^e gezondheidsbevorderende effect wel gevalideerd kan worden in de muizen.

De aanvrager kiest voor de categorie: translationeel of toegepast onderzoek. Uit de doelstellingen van het project namelijk het identificeren en valideren van gezondheidsbevorderende effecten en werkingsmechanismen zou dit project in de categorie fundamenteel onderzoek behoren. Kunt de keuze voor de categorie nader motiveren? We hebben gekozen voor 'translationeel of toegepast onderzoek' omdat in dit project onze *in vitro* resultaten worden gevalideerd in muizenstudies (*in vivo*). De translatie van effecten *in vitro* naar mogelijke effecten *in vivo* wordt dan gemaakt. Maar als u denkt dat dit type onderzoek beter past bij 'fundamenteel onderzoek' dan is het geen probleem voor ons om dit aan te passen.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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





Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

AVD401002015153

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl 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 40100
		<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 Stichting DLO
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde ██████████
		KvK-nummer 9098104
		Straat en huisnummer ██████████ ██████████
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postbus ██████████
		Postcode en plaats ██████████ Wageningen
		IBAN NL10 RABO 0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer Wageningen UR
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters ██████████ <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie Senior Onderzoeker
		Afdeling ██████████
		Telefoonnummer ██████████
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres ██████████
		(Titel) Naam en voorletters ██████████ <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie Onderzoeker
		Afdeling ██████████
		Telefoonnummer ██████████
		E-mailadres ██████████

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 15 - 6 - 2015 |
| Einddatum | 31 - 12 - 2015 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Het doden of verjagen van muizen in het open veld door middel van water, CO2 of behandeling met meststof (proof of principal).
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het doden of verjagen van muizen in het open veld door middel van water, CO2 of behandeling met meststof
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---------|
| Naam DEC | DEC-DLO |
| Postadres | |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € n.v.t. Lege
- Wijziging € nvt 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 [redacted]
- In overleg met [redacted] is dh [redacted] (art 9 bevoegd persoon) toegevoegd als plv. verantwoordelijk onderzoeker. Ivm afwezigheid van [redacted] is [redacted] tijdelijk gemandateerd vergunninghouder.

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 gehulst 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.

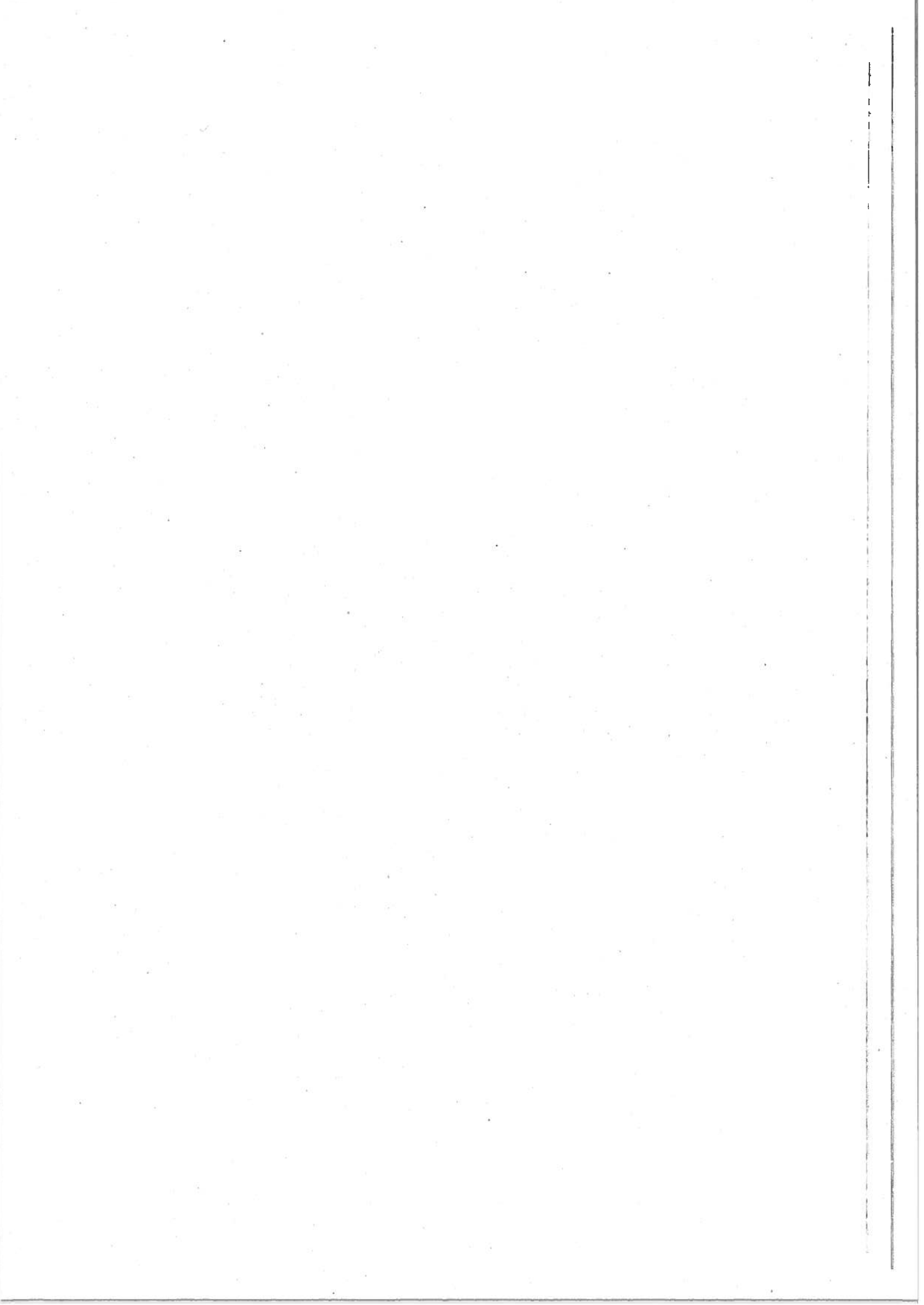
Naam [redacted]

Functie [redacted]

Plaats | Wageningen

Datum | 23 - 7 - 2015

Handtekening [redacted]





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002015152

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED],

Op 6 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica met aanvraagnummer AVD401002015152. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 31 augustus 2015 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting DLO

Wageningen

Nederland

Datum 10 Augustus 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**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
AVD401002015152

Uw referentie

Bijlagen
2

Geachte [REDACTED]

Op 6 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica" met aanvraagnummer AVD401002015152. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 juli 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld na vragen van het secretariaat.

Beslissing

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

U kunt met uw project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica" starten.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen Universiteit gevoegd d.d. 30 juni 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering met uitzondering van de aangevraagde looptijd van dit project.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Overwegingen

De vergunning wordt afgegeven van 01 september 2015 tot en met 01 maart 2018. Afwijkend van uw aanvraag voor een projectvergunning van 5 jaar, kent de commissie een periode van 2,5 jaar toe. Er zijn geen aanknopingspunten te vinden die een looptijd van 5 jaar rechtvaardigen. Op grond van de kennis en ervaring van de CCD acht de commissie een looptijd van 2,5 jaar meer in proportie tot het gevraagde aantal dierproeven en het gevraagde aantal dieren. Dit is mede gebaseerd op het in de aanvraag gestelde dat de 6 individuele proeven (3x2) parallel aan elkaar uitgevoerd kunnen worden en de individuele looptijd van op of omstreeks 10 weken. De

DEC is ten onrechte niet ingegaan op de ruim aangevraagde looptijd. Om die reden wijkt de CCD op dit onderdeel af van het advies.

Bezwaar

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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

Datum
10 augustus 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015152



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Stichting DLO
Adres: [REDACTED]
Postcode en woonplaats: [REDACTED] Wageningen
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 01-09-2015 tot en met 01-03-2018, voor het project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica" met aanvraagnummer AVD401002015152, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen Universiteit.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is senior scientist.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 06-07-2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 06-07-2015
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 06-07-2015
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 06-07-2015
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 24-07-2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. versterking van darmwand integriteit en immuunrespons	muis	92	matig	
Orale toediening van pre- en probiotica t.b.v verbeterde cholesterol regulatie	muis	92	licht	
Orale toediening van pre- en probiotica tbv preventie en vermindering van symptomen van metabool syndroom	muis	82	matig	

Voorwaarden

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

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

Datum
10 augustus 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015152

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

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Einde van een dierproef

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

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

Beoordeling achteraf

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

Deze beoordeling zal uiterlijk April 2021 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting DLO

Wageningen

Nederland

Datum 2 september 2015

Betreft Herziening Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**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
AVD401002015152

Uw referentie

Bijlagen
2

Geachte

Op 6 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica" met aanvraagnummer AVD401002015152 waarvoor op 10 augustus een vergunning is afgegeven. Op 19 augustus heeft u met nieuwe feiten en omstandigheden aangevoerd dat de argumentatie van de CCD om in de vergunning af te wijken van de aangevraagde looptijd van het project niet juist is. Wij hebben op basis van uw schrijven het besluit opnieuw beoordeeld.

Beslissing

De CCD heeft alle nieuwe feiten in overweging genomen en op basis hiervan besloten de looptijd voor de vergunning van uw project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica" met aanvraagnummer AVD401002015152 te herzien, de vergunning wordt afgegeven van 01 september 2015 tot 01 september 2020
Bijgaand treft u een herziene vergunning, hiermee vervalt de vergunning voor uw project AVD401002015152 zoals afgegeven op 10 augustus 2015.

Bezwaar

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

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

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

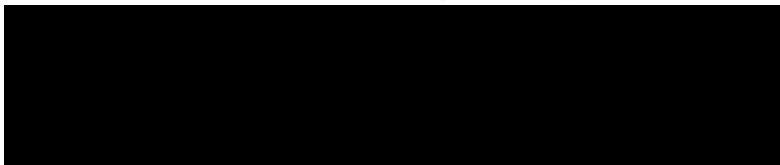
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning Herziening

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Stichting DLO
Adres: ██████████
Postcode en woonplaats: ██████████ Wageningen
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 september 2015 tot 01 september 2020, voor het project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica" met aanvraagnummer AVD401002015152, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen Universiteit.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is senior scientist.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 06 juli 2015.
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 06 juli 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 06 juli 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 06 juli 2015;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 24 juli 2015;
 - e. Motivatie voor verlening looptijd, ontvangen op 19 augustus 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Orale toediening van prebiotica en probiotica t.b.v. versterking van darmwand integriteit en immuunrespons	muis	92	matig	
Orale toediening van pre- en probiotica t.b.v verbeterde cholesterol regulatie	muis	92	licht	
Orale toediening van pre- en probiotica tbv preventie en vermindering van symptomen van metabool syndroom	muis	82	matig	

Voorwaarden

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

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

Datum
2 september 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002015152

melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Einde van een dierproef

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

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

Beoordeling achteraf

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

Deze beoordeling zal uiterlijk April 2021 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 7 augustus 2015 9:22
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: aanvullende vragen aan DEC Wageningen betreffend project AVD401002015152

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Excuus voor de wat late reactie, maar door vakanties en persoonlijke omstandigheden kon ik niet eerder reageren. Hieronder de toelichting van de DEC op de vragen van de CCD.

De DEC is bij er bij haar beoordeling van het project van uitgegaan, dat op basis van in-vitro-studies stoffen zullen worden geselecteerd, die veelbelovend zijn met het oog op gezondheidsbevordering. T.a.v. de fasering/ volgorde van de dierproeven heeft de DEC de beschreven situatie als leidend gezien, de afweging welk dierexperiment wordt gedaan volgt uit de in-vitro-data. Volgens de DEC is dit een legitieme en juist gekozen route. De DEC heeft de afweging gemaakt op basis van het feit dat er beschreven wordt dat er per resultaat een opzet wordt bepaald en hierbij aangenomen dat er per in-vitro-proef 1, 2 of alle 3 beschreven proeven worden uitgevoerd. De gegevens die in vitro worden gemeten worden door de onderzoeker geanalyseerd en hierop wordt bepaald hoe verder te gaan. De DEC vindt dat deze keuze door de onderzoeker situationeel gemaakt moet worden, en heeft daarmee het advies tot vergunnen aan de CCD gegeven.

De manier waarop het werkingsmechanisme zal worden onderzocht staat m.n. beschreven onder 'haalbaarheid studie' punt 1-4. Daarnaast wordt er uitgebreid stilgestaan bij de haalbaarheid en vertaalbaarheid. De darmpermeabiliteit zal bijvoorbeeld worden getest met FITC. Het achterliggende werkingsmechanisme van een gezondheidsbevorderend effect is dan darmpermeabiliteit. Zo heeft de DEC dit opgevat. Het project is niet fundamenteel van aard in die zin dat het zich niet richt op het onderzoeken van volledig moleculaire werkingsmechanismen. Om die reden heeft de DEC geoordeeld dat het project translationeel is en niet fundamenteel.

In de DEC is niet expliciet ingegaan op de vraag, of de pre- en probiotica die worden geïdentificeerd uit het in-vitro-onderzoek mogelijk op meerdere van de geselecteerde parameters tegelijkertijd een effect zouden kunnen hebben en welke consequenties dit heeft voor de projectopzet.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Wageningen Universiteit

tel. [REDACTED]

<http://www.wageningenur.nl/>

Bezoekadres:
Droevendaalsesteeg 4
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
Wageningen

Intern postadres:
[REDACTED]

Disclaimer

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de afdeling Corporate Governance & Legal Services is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: maandag 20 juli 2015 13:29

Aan: [REDACTED]

Onderwerp: aanvullende vragen aan DEC Wageningen betreffend project AVD401002015152

Geachte leden van de DEC Wageningen,

Op 6 juli 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica" met aanvraagnummer 401002015152 waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. In het advies en de aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. De beslissing van de CCD om tot vergunning van een project over te gaan is gebaseerd op een gemotiveerd advies van een DEC. Voor de CCD is een aantal aspecten uit de projectaanvraag betreffende de doelstelling en haalbaarheid van het project nog onduidelijk, en is onduidelijk of deze aspecten zijn besproken bij de afweging door de DEC. Om tot een goede afweging te komen heeft de CCD nog antwoord op een aantal vragen nodig. Voordat deze aan de aanvrager/ onderzoeker worden gesteld zou de CCD graag van u horen of de DEC in de vergadering deze aspecten heeft besproken en wanneer dit het geval is, of u uw advies kunt aanvullen op deze punten.

Het project beoogt als doelstelling gezondheidsbevorderende effecten van pre- en probiotica te identificeren en het achterliggende werkingsmechanisme te achterhalen. In de aangevraagde dierproeven worden robuuste uitleesparameters beschreven, die mogelijk wel gezondheidsbevorderende effecten kunnen laten zien, maar die geen informatie geven over het mogelijke werkingsmechanisme. Uit de beschrijving van de ex-vivo analyses wordt niet duidelijk welke mogelijke werkingsmechanismen nader worden onderzocht, hoe deze worden onderzocht en of het uitvoeren van deze analyses afhankelijk is van de uitkomsten van de (robuuste) uitleesparameters in vivo. Omdat (gezondheids)effecten door het toedienen van pre- en probiotica mogelijk subtiel zijn hoort de CCD graag de motivering van de DEC over criteria op basis waarvan aanvullende analyses worden gedaan omdat dit mogelijk consequenties heeft voor het behalen van deze doelstelling.

In het projectvoorstel wordt beschreven dat de dierproeven niet in een vaste volgorde worden uitgevoerd. Uit het projectvoorstel wordt niet duidelijk of de pre- en probiotica welke worden geïdentificeerd uit het in vitro onderzoek mogelijk op meerdere van de geselecteerde parameters tegelijkertijd een effect zouden kunnen hebben. In geval meerdere gezondheidseffecten worden verwacht zou naar de mening van de CCD een gefaseerde inzet van proefdieren mogelijk zijn, waarbij go/no go criteria geformuleerd kunnen worden op basis waarvan een volgende dierproef wordt gestart. Heeft de DEC hierover in de vergadering gesproken?

De aanvrager kiest voor de categorie: translationeel of toegepast onderzoek. Uit de doelstellingen van het project namelijk het identificeren en valideren van gezondheidsbevorderende effecten en werkingsmechanismen zou, naar de mening van de CCD dit project in de categorie fundamenteel onderzoek behoren. Kan de DEC de keuze voor de categorie nader motiveren?

Voor een tijdige afhandeling van deze projectaanvraag zouden we graag uiterlijk donderdag 16 juli van u vernemen of deze vragen in de DEC vergadering behandeld zijn. Na donderdag zullen wij de aanvrager / onderzoeker benaderen.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 28 augustus 2015 13:25
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: beschikking AVD401002015152

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Erg fijn, dank voor de snelle berichtgeving!

Groeten,
[REDACTED]

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: vrijdag 28 augustus 2015 13:10
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: RE: beschikking AVD401002015152

Geachte [REDACTED]

Middels deze mail wil ik u alvast laten weten dat de Commissie kennis heeft genomen van uw argumentatie betreffende de aangepaste looptijd van project AVD401002015152. De commissie kan zich vinden in deze argumentatie en zal de vergunning voor de looptijd van dit project aanpassen zodat de vergunning conform uw aanvraag wordt verleend. U ontvangt zo spoedig mogelijk de aangepaste vergunning,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 19 augustus 2015 16:42
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: beschikking AVD401002015152

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Zeer verheugd zijn wij met de goedkeuring van onze projectaanvraag. Echter, in plaats van de aangevraagde looptijd van 5 jaar kent u een looptijd van 2,5 jaar toe voor de uitvoering van het project. Na telefonische contact met het CCD, stuur ik u bij deze onze uitgebreide argumentatie (zie bijlage) waarom wij een langere looptijd voor ons project nodig achten en deze dus zeer wenselijk zou zijn.

Wij hopen dat u op basis van onze argumenten uw eerdere beslissing wilt heroverwegen en een langere looptijd toe kunt kennen aan het project.

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Wageningen UR

Wageningen, NL

Tel.

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: maandag 10 augustus 2015 16:30
To: [redacted]
Subject: beschikking AVD401002015152

Geachte [redacted]

Hierbij ontvangt u de beschikking van de CCD betreffend uw aanvraag "Identificatie en validatie van gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica en probiotica". De documenten worden u ook nog per brief toegezonden. Bijgevoegd is het advies van de DEC Wageningen universiteit waarop het besluit is gebaseerd,

Vriendelijke groet, [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 2 september 2015 16:20
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: beschikking AVD401002015152
Bijlagen: BeschikkingAVD401002015152.pdf

Geachte [REDACTED]

Zoals eerder gezegd in onderstaande mail, ontvangt u hierbij de herziene beschikking van uw project AVD401002015152. De looptijd is aangepast naar 5 jaar conform uw oorspronkelijke aanvraag. De herziene beschikking en vergunning wordt u ook per post toegestuurd. Hiermee vervalt de eerder verstuurd beschikking.

Met vriendelijke groet [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 28 augustus 2015 13:10
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: beschikking AVD401002015152

Geachte [REDACTED]

Middels deze mail wil ik u alvast laten weten dat de Commissie kennis heeft genomen van uw argumentatie betreffende de aangepaste looptijd van project AVD401002015152. De commissie kan zich vinden in deze argumentatie en zal de vergunning voor de looptijd van dit project aanpassen zodat de vergunning conform uw aanvraag wordt verleend. U ontvangt zo spoedig mogelijk de aangepaste vergunning,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Inventaris Wob-verzoek W15-12									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015156								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5			x					
9	Bijlage beschrijving dierproeven 6			x					
10	Mail DEC-advies 26-6-2015				x		x	x	
11	DEC-advies				x		x	x	
12	Mail ontvangstbevestiging 29-6-2015				x		x	x	
13	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
14	Mail aanvullende informatie DEC 16-7-2015				x		x	x	
15	Mail verzoek aanvullende informatie 21-7-2015				x		x	x	
16	Verzoek aanvullende informatie				x		x	x	
17	Reactie aanvullende informatie				x		x	x	
18	Advies CCD		x						x
19	Beschikking				x		x	x	
20	Vergunning				x		x	x	
21	Mail beschikking 13-8-2015				x		x	x	
22	Mail terugkoppeling DEC 13-8-2015				x		x	x	



29 JUN 2015

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Ja > Vul uw deelnemernummer in 24700
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
 Naam instelling of organisatie Brains On-Line B.V.
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]
 KvK-nummer 2 0 9 4 7 2 4

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.
 Straat en huisnummer De Mudden 16
 Postbus
 Postcode en plaats 9747AW Groningen
 IBAN NL59INGB0681766174
 Tenaamstelling van het rekeningnummer BRAINS ON-LINE BV

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
 (Titel) Naam en voorletters [Redacted] Dhr. Mw.
 Functie [Redacted]
 Afdeling
 Telefoonnummer [Redacted]
 E-mailadres [Redacted]

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
 (Titel) Naam en voorletters [Redacted] Dhr. Mw.
 Functie [Redacted]
 Afdeling
 Telefoonnummer [Redacted]
 E-mailadres [Redacted]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 5 _ 0 6 _ 2 0 1 5
- Einddatum 1 5 _ 0 6 _ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Testen van geneesmiddelen met behulp van biologische en elektronische sensoren
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-RUG
- Postadres _____ Groningen
- E-mailadres secrdec.umcg@umcg.nl

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Bijlagen (6)

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam

Functie

Plaats

Groningen

Datum

26_06_2015

Handtekening



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Neurologische ziekten zoals de ziektes van Alzheimer, Parkinson en Huntington schizofrenie, chronische pijn en epilepsie zijn wereldwijd een van de grootste groepen van ziektes met daaraan gerelateerde economische consequenties. Ongeveer 25% van alle mensen hebben tijdens hun leven last van een neurologische aandoening. Door de demografische ontwikkelingen zal dit aantal alleen maar toenemen. De meeste therapieën zijn momenteel gericht op het herstellen van verbindingen in de hersenen. Op dit moment komen er jaarlijks 10-15 nieuwe stoffen op de markt die werkzaam zijn tegen deze ziekten, waar dat een aantal jaren geleden op het tienvoudige lag. Belangrijkste reden hiervoor (volgens "Medicines in Development for Neurological Disorders 2013" (rapportage van America's biopharmaceutical research companies)) zijn strengere en in aantal toegenomen toelatingseisen voor geneesmiddelen. Dit veroorzaakt een toename in tijdsduur en kosten die bij ontwikkeling van geneesmiddelen benodigd zijn. Met het huidige project is het de bedoeling een bijdrage te leveren aan het onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen. Het doel is om farmaceutische bedrijven een passend inzicht te geven in de mogelijkheden van hun stof. Doestelling is hierbij dat door het concentreren van de expertise en het gebruiken van de modernste technieken sneller, en voor de maatschappij kosten efficiënter, tot een antwoord te komen. Hierbij wordt ook altijd gekeken naar welke test-methode het meest geschikt is voor het beantwoorden van een specifieke vraagstelling, en wordt rekening gehouden met de drie Vs: vervanging, vermindering en verfijning.

Het hier voorgestelde project bouwt voort op lopende projecten binnen ons bedrijf. Het bedrijf biedt contract onderzoek aan waarbij een aantal verschillende platforms voor het testen van nieuwe geneesmiddelen kunnen worden ingezet. In dit project beschrijven wij een tweetal technieken waarbij elektrodes bij het dier worden ingebracht. Deze elektrodes zijn geschikt om direct elektrische signalen af te leiden, of ze zijn door een biologisch active-coating geschikt gemaakt voor de detectie van specifieke biomoleculen. Metingen worden voornamelijk uitgevoerd in het centraal zenuwstelsel, maar kunnen ook perifeer worden toegepast.

De platforms vooral zoals verwoord in bijlagen 2, 4, 5 en 6 bevatten een aantal protocollen die inmiddels als SOPs worden ingezet binnen ons bedrijf voor het onderzoeken van potentiële geneesmiddelen tegen neurologische ziekten. Wij zijn van mening dat deze platforms niet alleen zeer geschikt zijn om te kijken naar farmacologische effecten van nieuwe potentiële geneesmiddelen in gezonde dieren, maar ook inzetbaar zijn om het effect van de potentiële nieuwe stof te testen in een toepasselijk pathologisch model. In de genoemde bijlagen zullen dan ook enkele voorbeelden van ons bekende modellen worden gegeven, wij zouden toepassing van de SOP echter niet willen beperken tot deze modellen, omdat onze sponsors vaak op basis van eigen vooronderzoek kiezen voor een specifiek model voor een ziekte, of omdat zij gebruik willen maken van de nieuwste beschikbare modellen in het onderzoeksveld. Hierbij moet voorop worden gesteld dat pathologie modellen die een duidelijk intrinsiek ongerief veroorzaken dat in een hogere categorie valt dan de hier aangevraagde (II matig) niet in aanmerking komen voor toepassing onder deze aanvraag.

Platform 1 Mircosensoren:

Neuronen communiceren door middel van elektrische signalen en signaalstoffen (o.a. neurotransmitters). Deze stoffen beïnvloeden op hun beurt de elektrische communicatie tussen cellen. Het meten en beïnvloeden van de elektrische signalen wordt hieronder beschreven in het gedeelte over electrofysiologie. De microsensoren die wij ontwikkelen zijn gericht op de detectie van de signaalstoffen. De belangrijkste signaalstoffen beschikbaar in de hersenen zijn de neurotransmitters die door interactie met de pre- en postsynaptische receptoren de elektrische signaaltransductie reguleren. In het recente

verleden hebben wij sensoren ontwikkeld voor de bepaling van glutamaat, GABA en acetylcholine. De huidige sensor is gebaseerd op een enzymatische omzetting van een bio-marker, waarbij een bekend aantal elektronen wordt overgedragen. Door deze enzymen te coaten op een sensor met een bekend spanningsverschil en de stroom te meten kan worden berekend hoeveel moleculen worden omgezet per tijdseenheid. De sensoren kunnen worden ingezet om met een zeer goede tijds- en ruimtelijke- resolutie, de niveaus van deze neurotransmitters te bepalen. Aangezien receptoren voor deze neurotransmitters gevonden worden in alle hersengebieden hebben werkzame stoffen op deze neurotransmissie vaak een brede uitwerking. Tevens spelen deze neurotransmitters een grote rol bij ziektes van het centraal zenuw stelsel zoals bijvoorbeeld, maar niet uitsluitend, de ziektes van Parkinson, Alzheimer, Huntington en Schizofrenie.

Naast deze ziektes spelen de hersenen ook een belangrijke rol bij perifere ziektes zoals diabetes, een ongeneeselijke ziekte waaraan wereldwijd bijna 300 miljoen mensen lijden. In de homeostase van voedselopname en energieverbruik spelen de hersenen een centrale rol. Op basis van detectie van niveaus van glucose, pyruvaat en lactaat, maar bijvoorbeeld ook van ATP bepalen de hersenen hoe de energie huishouding in balans moet worden gebracht. Ook voor deze biomarkers zijn inmiddels microsensoren ontwikkeld. Deze sensoren zouden overigens ook ingezet kunnen worden in onderzoek naar effecten van of geneesmiddelen tegen acidose.

Toepassing van de microsensoren geeft inzicht in de mechanismen van signaaltransductie in-vivo en werking van potentiële nieuwe geneesmiddelen. De methode wordt gezien als een zeer veel belovende analyse techniek voor toekomstige testen op nieuwe geneesmiddelen. Dergelijke testen zijn voorgeschreven door EMEA (European Medicines Administration) en de FDA (Food and Drug Administration).

Platform 2 Electrofysiologie:

Een tweede belangrijke methode om werkingsmechanismen en effectiviteit van een potentieel nieuw geneesmiddel te onderzoeken is het meten van de elektrische signalen in de hersenen. Veel bekende neuropathologieën zijn gebaseerd op een verandering van de vuurfrequentie van individuele cellen of een verandering in het aantal cellen dat elektrische signalen afgeeft. Door de verandering van het aantal signalen wordt de neurotransmissie beïnvloed, wat de ontwikkeling van neuropathologieën tot gevolg kan hebben. Door de vuurfrequentie van actief (autonoom) of passief (in reactie op een externe chemische of elektrische stimulus) vurende neuronen te meten en de uitwerking van stoffen op het vuren is het mogelijk om de farmacologische uitwerking van deze stoffen te bepalen.

Met behulp van dezelfde technieken is het ook mogelijk om elektrische signalen te meten in spierweefsel en zenuwbanen in het ruggenmerg. Meten van de signalen hier is van belang bij de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen pijn (zoals neuropathische pijn, pijn bij kanker) en spierziekten (zoals m.s.).

De kennis verworven in onderzoeken met bovenstaande methoden is translationeel, omdat ze tot op zekere hoogte een voorspelling geven van de werking van potentiële nieuwe geneesmiddelen bij toepassing in humane patienten. In ieder geval is het mogelijk om theorieën te testen over werkingsmechanismen van de stoffen. Uitvoeren van dit type preklinische testen is van groot belang voor het snel en goed selecteren van kandidaat stoffen voor verder klinisch onderzoek. Daarnaast is de informatie die wordt gewonnen uit deze experimenten van belang voor de wettelijke eis dat nieuwe geneesmiddelen moeten worden getest alvorens zij op de markt mogen worden toegelaten. Zowel EMEA (European Medicines Administration) als de FDA (Food and Drug Administration) vereisen voor nieuwe geneesmiddelen dat veiligheid en werkzaamheids (efficacy) farmacologie worden getest in ten minste twee typen proefdieren waarvan minimaal één niet knaagdier soort. De experimenten beschreven in deze aanvraag dragen bij aan informatie over de werkzaamheids farmacologie.

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?

Hoofddoel van het huidige project is om via relevante platforms nieuwe farmaceutisch actieve stoffen gericht op het genezen van ziektes van met name het centraal zenuwstelsel (zoals de ziekten van Huntington, Alzheimer en Parkinson, maar ook multiple sclerose en chronische pijn) te testen op werkzaamheid. Tevens zijn de platforms zeer geschikt om observaties van neurologische bijverschijnselen van potentiële nieuwe geneesmiddelen voor andere ziekten nader

te bestuderen. De in deze aanvraag beschreven testmethoden zijn allen gebaseerd op versterking van (indirecte) elektrische signalen uit biologische systemen. Bij uitstek is het onderzoek erop gericht om metingen in het complete organisme uit te voeren om alle aspecten van de fysiologie en het metabolisme mee te kunnen nemen. Het is niet alleen de bedoeling de op dit moment ontwikkelde methoden in te zetten, maar ook om deze verder te ontwikkelen. Hierbij wordt rekening gehouden met de drie V's, waarbij nieuw ontwikkelde methoden dus moeten zorgen voor vermindering of verfijning en eventueel voor vervanging.

Microsensoren:

- Is het mogelijk nieuwe sensoren te ontwikkelen gericht op relevante biomarkers voor ziekten (met een focus op ziekten van het centraal zenuw stelsel)?
- Veroorzaken nieuwe potentiële geneesmiddelen veranderingen in de concentratie van de biomarker van interesse (betrokken bio-marker bij het ziekte proces)? Welk onderliggend mechanisme veroorzaakt de concentratie verandering? Is het effect van het potentiële geneesmiddel te prefereren boven dat van bestaande geneesmiddelen (potentie/bijwerkingen)?

Electrofysiologie:

- Welke electrofysiologische technieken gebaseerd op onze bestaande technieken zijn geschikt om te gebruiken in ten behoeve van onderzoek aan nieuwe potentiële geneesmiddelen? In welke hersengebieden is het mogelijk de vuurfrequentie van neuronen farmacologisch te beïnvloeden.
- Veroorzaken nieuwe potentiële geneesmiddelen meetbare electrofysiologische veranderingen in relevante hersengebieden? Welk onderliggend mechanisme veroorzaakt de verandering in vuurfrequentie? Is het effect van het potentiële geneesmiddel te prefereren boven dat van bestaande geneesmiddelen (potentie/bijwerkingen)?

De hierboven beschreven vraagstellingen zijn allen te beantwoorden met de in de bijlagen beschreven experimentele handelingen. Gezien de technische achtergrond: versterking van (indirecte) elektrische signalen uit biologische systemen zien wij de experimenten als een toetsbare eenheid. Haalbaarheid van de experimenten is gebleken uit het feit dat de beschreven experimenten al sinds langere tijd bij ons bedrijf worden uitgevoerd door zeer ervaren en gespecialiseerde medewerkers.

3.3 Belang

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

Voor zowel de microsensoren als de electrofysiologie geldt dat de maatschappij belang heeft bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen tegen ziektes van het centraal zenuw stelsel. Deze ontwikkeling kan alleen gepaard gaan als deze potentiële geneesmiddelen worden getest op effectiviteit en werkingsmechanisme. Van een groot aantal van de bestaande geneesmiddelen blijkt dat ze in de praktijk niet voldoende effectief zijn bij alle patienten of dat er problemen optreden door bijwerkingen. Voor een deel worden deze problemen opgelost door betere kennis van het werkingsmechanisme van (nieuwe) stoffen of toedieningsvormen, maar ook door basale kennis over neuronale signaaltransductie. De in deze experimenten toegepaste technieken kunnen helpen bij het beantwoorden van deze vragen.

Het produceren van nieuwe, efficiëntere en meer robuuste sensoren (met bijvoorbeeld een grotere gevoeligheid en of betere houdbaarheid) voor bio-markers is een belangrijke ontwikkeling voor zowel wetenschap als maatschappij. Hierbij moet worden gedacht aan het vroegtijdig herkennen van ziektes op basis van bio-markers. Tevens zouden de sensoren ook kunnen worden ingezet voor een verbeterde kwaliteit van leven. De sensoren bieden de mogelijkheid om continu verschillende bio-markers voor ziektes te monitoren. Wanneer deze biomarkers boven of onder een bepaalde ingestelde limiet komen, zouden ze een signaal kunnen afgeven waarmee een pomp wordt geactiveerd. De sensor zou hierdoor een meer invasieve meting en toediening kunnen vervangen. Men kan hierbij bijvoorbeeld denken aan zowel het meten van bloedsuiker als het toedienen van insuline bij suikerpatienten dat wordt vervangen door een enkel meet en regelsysteem dat éénmalig moet worden geïmplant. Hierbij is van groot belang dat een sensor wordt ontwikkeld die voor langere tijd in het lichaam megedragen kan worden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het hier aangevraagde project gebruikt verschillende meettechnieken gebaseerd op versterking van elektrische signalen ter bestudering van het centraal zenuwstelsel en een aantal perifere systemen. Het project bevat verschillende modules die naar keuze kunnen worden ingezet afhankelijk van de vraagstelling met betrekking tot het geneesmiddel of de biomarker van interesse. Deze vraagstelling gaat vaak over een specifiek (deel-)mechanisme van de werking van een nieuwe of bestaande stof testen. De beschrijving van de verschillende modules is te vinden in paragraaf 3.4.2.

Voor de ontwikkeling van sensoren voor nieuwe biomarkers is sprake van een plan met enkele opeenvolgende stappen. Voor alle proeven die worden uitgevoerd in het kader van dit project geldt dat onder anesthesie één of meerdere electrodes worden ingebracht bij het dier. Voor de electrofysiologische experimenten geldt dat de experimenten non-recovery zijn. Voor de sensoren is het mogelijk om ze met behulp van transponder technieken ook in vrij bewegende dieren, die de mogelijkheid krijgen gedrag te vertonen, uit te voeren. Testen voor stabiele lange termijn implantatie (tot 30 dagen) van sensoren wordt ook uitgevoerd in vrij bewegende dieren.

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

Ontwikkeling van nieuwe microsensoren:

De ontwikkeling van een nieuwe microsensor is gebaseerd op een vraagstelling naar het meten van een specifieke nieuwe biomarker, of van een bestaande biomarker waarvoor de gevoeligheid met andere methoden of de resolutie in tijd en ruimte niet hoog genoeg is. De eerste ontwikkeling van een dergelijk sensor vindt plaats in-vitro. Na een literatuurstudie naar een geschikt biomolecuul (bijvoorbeeld: enzyme/antibody/nucleinezuur) op basis waarvan de sensor gemaakt zou kunnen worden (op basis van substraat-specificiteit, te verwachten metabolieten en de noodzaak van een verandering in elektrische eigenschappen van de sensor in reactie op substraat binding) kan een eerste prototype sensor in elkaar worden gezet. Hierbij is vooral onze kennis over polymerisatie van de "supportlayers" van groot belang. Een dergelijke sensor moet getest worden op selectiviteit voor de bio-marker, gevoeligheid voor de bio-marker (als deze niet volstaat in fysiologische condities, heeft het geen zin de sensor in-vivo te testen) en op stabiliteit, het signaal moet minimaal één dag sterk genoeg zijn om te kunnen meten. Voor dit deel van het project zijn geen dierproeven nodig.

Als aan alle bovenstaande condities is voldaan kan worden gestart met de in-vivo validering van de sensor. Deze wordt altijd onder anesthesie uitgevoerd op het target gebied van interesse, bijvoorbeeld een specifiek hersen gebied. In parallel met de metingen met de sensor worden vaak ook bloed of microdialyse monsters genomen om een tweede onafhankelijke meting uit te kunnen voeren of de met de sensor gemeten waarden overeenkomen met de op andere wijze gemeten waarden. Plasma en dialyse monsters kunnen met behulp van massaspectrometrie of ELISA worden gequantificeerd. In eerste instantie wordt gekeken naar basale niveaus van de bio-marker. Door in-situ de biomarker concentratie te verhogen kan worden getest of de sensor ook reageert op veranderingen. Als de sensor voldoet kan worden gekozen voor een eerste farmacologische beïnvloeding met een bekende stof. Voor dit deel van het project wordt gebruik gemaakt van dieren onder anesthesie. Bij voorkeur, maar niet uitsluitend, worden ratten gebruikt vanwege het lichaamsformaat.

Toepassen van reeds gevalideerde microsensoren:

Op dit moment hebben wij bij Brains On-Line een aantal sensoren die reeds zijn gevalideerd op bovenstaande wijze. Het gaat hier om sensoren voor: glutamaat, gamma-aminoboterzuur (GABA), (acetyl-)choline, glucose, lactaat/pyruvaat, waterstofperoxide en ATP. Deze sensoren zijn geschikt voor toepassing in de hersenen en perifeer weefsel. Farmacologische beïnvloeding van de biomoleculen is mogelijk met bestaande stoffen, de veranderingen in concentratie zijn meetbaar in-vivo. Deze sensoren zijn geschikt voor meten van effecten van bestaande en nieuwe farmaca gericht op glutamaterge, gaba-erge of cholinerge neurotransmissie of het beïnvloeden van de energiebalans. Deze experimenten kunnen zowel in rat als muis worden uitgevoerd (afhankelijk van het doelgebied), meestal worden ze onder anesthesie uitgevoerd, omdat de sensoren niet altijd robuust genoeg zijn om vrije beweging toe te laten (gevaar van breken, maar ook van stoorsignalen).

Doorontwikkeling van gevalideerde microsensoren:

Sensoren die aantoonbaar functioneel zijn voor in-vivo toepassingen moeten worden voorbereid voor gebruik in een meer klinische setting, zodat ze in de toekomst kunnen dienen als basis voor meet en regel instrumenten (bv. insuline pomp bij diabetes). Hiervoor zijn drie stappen nodig: de sensoren moeten

robuust genoeg zijn om in vrij bewegende dieren (en mensen) intact te blijven. De sensoren moeten voorbereid worden om zonder additionele bedrading te functioneren (in vrij bewegende dieren). Hiervoor is het mogelijk met een kleine versterker op het lichaam te werken die telemetrische data kan doorsturen voor uitlezen. Een eerste versie van een dergelijk systeem is in het verleden getest, alternatieve systemen met minder achtergrond signaal zijn beschikbaar en zouden ook getest kunnen worden. De tweede belangrijke stap is biocompatibiliteit van het gebruikte materiaal deze moet geoptimaliseerd om de levensduur van de sensoren te verlengen. Verder wordt het programma gebruikt om te kijken naar mogelijkheden om gevalideerde sensoren te combineren met bestaande sensoren voor bijvoorbeeld electrocardiografie. Doel is om deze experimenten waar mogelijk in vrij bewegende dieren uit te voeren, bij voorkeur gaat het dan weer om ratten in verband met de grootte van de telemetrie zender.

De technieken voor electrofysiologie zijn voldoende ontwikkeld binnen Brains On-Line en zullen altijd worden toegepast als bestaande techniek. De techniek valt uiteen in drie gebieden. Deze zullen hieronder apart beschreven worden, als ook de mogelijkheden tot het verder ontwikkelen binnen de techniek.

In-vivo single unit electrophysiology:

Bij deze methode wordt een glaselectrode langzaam door een opening in de schedel naar binnen gebracht. Ter hoogte van het hersengebied met de doelcellen wordt een meting aangevangen. Bij deze meting wordt de vuurfrequentie van de cellen bepaald ofwel het aantal actieve cellen per trackt (in dat geval wordt ook nog vaak de vuurfrequentie bepaald). Door toedienen van farmaca of bij bepaalde genetisch gemodificeerde diermodellen veranderen de vuurfrequentie of het aantal actieve cellen per trackt. Dit kan een indicatie zijn voor het werkingsmechanisme van de gemodelleerde ziekte of de toegediende stof. Op dit moment zijn er zeven celtypes die wij op basis van onze kennis goed kunnen karakteriseren en bestuderen. In de toekomst zouden dit er meer kunnen worden. Alle experimenten worden uitgevoerd onder anesthesie in zowel ratten als muizen.

LTP/LTD:

Long term potentiation of long term depression metingen kunnen worden uitgevoerd op vergelijkbare wijze als metingen voor in-vivo single unit. Bij dit type van studie zijn de cellen echter niet spontaan actief, maar reageren ze op een stimulatie (met behulp van een tweede electrode) vanuit een tweede hersengebied. De stimulerende electrode geeft signalen af met een specifieke frequente die excitatoire post-synaptische potentialen opwekken, deze potentialen stimuleren de (post-synaptische) neuronen, waarvan de vuurfrequentie gemeten kan worden na deze stimulatie. De postsynaptische neuronen beginnen ook te vuren, waarbij de amplitude afhankelijk is van de stimulatie en/of farmacologische beïnvloeding. LTP en LTD zijn een maat voor synaptische plasticiteit. Synaptische plasticiteit is weer te relateren aan cognitieve functies (leren en geheugen). Gebaseerd op statistische analyse hebben we voor dit type experimenten 6 dieren per groep nodig. Tot nog toe zijn deze experimenten alleen in ratten uitgevoerd, maar wij zouden graag kijken naar de mogelijkheid om het ook in muis uit te voeren. Daarnaast is tot op heden alleen gekeken naar interactie tussen de Schaffer collateraal en de piramidale cellen in het CA1 gebied van de hippocampus. Het zou interessant kunnen zijn om in de toekomst ook naar interacties tussen andere hersengebieden te kijken bijvoorbeeld in het kader van synaptische plasticiteit bij bijvoorbeeld de ziekte van Parkinson of schizofrenie. Alle experimenten worden onder anesthesie uitgevoerd.

Spinal cord neuronen en electromyography:

Spinal cord neuronen worden op vergelijkbare wijze als hierboven beschreven voor de single unit electrophysiology gemeten. Het opereren van het dier onder anesthesie is een iets uitgebreidere procedure, omdat eerst de ruggenwervels vrijgeprepareerd moeten worden, en daarna het bot verwijderd. Pas dan is het mogelijk een pipet te laten zakken tot de juiste diepte voor metingen van de elektrische signalen. Deze routine techniek wordt in verschillende laboratoria over de wereld ingezet, maar nergens aangeboden als onderdeel van een geneesmiddelen evaluatie programma. Waar nodig en mogelijk werken wij samen met de academische experts op dit gebied om de techniek zo efficiënt mogelijk in te zetten. Intern is er ervaring met het vrijprepareren van de zenuwbanen in het ruggenmerg in een experimentele methode voor microdialyse en voor sensing.

De Hoffmann (H-) en flexor (M-) reflexen zijn beschreven voor zowel de mens als in de rat. De H-reflex wordt toegeschreven aan monosynaptische excitatie door de afferente neuronen van de primaire spierspoelen van de alpha motorneuronen. De M-reflex is een directe excitatie door de motorneuronen. Het verschil in amplitude en de tijdsduur tussen meting van de twee excitatoire potentialen is een maat voor de geleiding van de motorneuronen. Deze kunnen door verschillende ziektes (MS en de ziekte van Parkinson) door beschadiging van de zenuw of door pijn worden beïnvloed. Het meten van de potentialen is

tijdens een pilot studie gevalideerd. In vervolg studies willen we kijken naar pathologie modellen en bijpassende farmacologische mogelijkheden tot herstel. Alle experimenten worden onder anesthesie uitgevoerd, bij voorkeur in ratten.

Voor alle beschreven toepassingen kan het zinvol zijn een tweede sensor / sonde / catheter voor bloedmonster afname bij het dier aan te brengen. Een dergelijke sensor / sonde / catheter dan data opleveren die de gemeten data kan valideren, of die verdere informatie kan leveren als de farmacokinetiek (verdeling van de compound over het lichaam over de tijd). Door het vergelijken van dergelijke data met data uit bijvoorbeeld gedragsexperimenten is het mogelijk een koppeling te maken tussen dat uit verschillende toegepaste diermodellen (aangeboden platforms binnen ons bedrijf).

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.

Zoals hierboven beschreven is de belangrijkste samenhang tussen de beschreven experimenten gebaseerd op de centrale techniek van het versterken van elektrische signalen opgewekt in biologische systemen. De elektrische signalen zijn danwel directe actie-potentialen ofwel veranderingen in de elektrische eigenschappen van een sensor ofwel een stroom opgewekt door biochemische conversie van een geselecteerd substraat.

Faseringen:

Ontwikkeling van nieuwe microsensoren: Ontwikkeling van nieuwe microsensoren start altijd met het zoeken naar een geschikt bio-actief molecuul voor het substraat (de biomarker van interesse). Als een passend molecuul gevonden is, moet worden gecontroleerd of conversie van het substraat leidt tot een verandering in elektrische eigenschappen of vorming van elektronen die kunnen worden gemeten en geamplificeerd. Het is van groot belang te testen of de gevoeligheid van het systeem laag genoeg is om in fysiologisch relevante concentraties te kunnen meten. Alleen als het geval is, is het zinvol om ook daadwerkelijk in een in-vivo systeem onder anesthesie te gaan meten. Daarbij moet goed worden gelet op biologische of elektronische interferentie in het systeem. Door toediening van het substraat van interesse kan worden gekeken of in-vivo sensitiviteit en limiet van kwantificeren ook kan worden gehaald en of het mogelijk is om real time veranderingen te meten. Milestones zijn nieuw ontwikkelde sensoren voor toepassing in studies naar effecten van nieuwe geneesmiddelen.

Toepassen van reeds gevalideerde microsensoren: Wanneer een sensor effectief is gebleken in bovengenoemde in-vivo testen kan deze worden ingezet voor het meten van biomarkers in proefdieren en de effecten van nieuwe of bestaande farmaceutische verbindingen op de levels van deze biomarkers. Op dit moment hebben wij sensoren in dit stadium voor glutamaat, GABA, Acetylcholine (en Choline), Glucose, Lactaat, Pyruvaat, waterstofperoxide en ATP. De milestones voor deze experimenten zijn de behaalde resultaten per potentieel nieuw geneesmiddel.

Doorontwikkeling van gevalideerde microsensoren: De doorontwikkeling van de sensoren vindt plaats op meerdere vlakken. Allereerst wordt er gewerkt aan een draadloos systeem. Hierbij wordt gebruik gemaakt van bestaande telemetrie (en versterker) eenheden die worden gekoppeld aan de sensor. Een tweede ontwikkeling is toepassing van de lactaatsensor in de humane verloskunde. Deze sensor zou vlak voor en tijdens de partus kunnen worden ingezet om de verzuring in het bloed van een nog ongeboren kind te kunnen volgen, gelijktijdig met meting van hartfrequentie en zuurstofsaturatie. Voor deze toepassing moet de reeds bestaande sensor zo worden gemodificeerd dat hierop de lactase kan worden gecoat en de enzymactiviteit op basis van elektrische geleiding kan worden bepaald. Een vergelijkbaar proces zou kunnen worden ondernomen voor de ontwikkeling van een glucose sensor met toepassingen voor diabetes. Verdere toepassingen zouden kunnen worden gevonden in het bestuderen van lactaat en pyruvaat tijdens inspanningsoefeningen. Voor al deze toepassingen in-vivo in vrijbewegende dieren of mensen is het ook van belang aandacht te besteden aan de robuustheid van de sensor. Ook hiervoor zouden individuele experimenten in proefdieren zinvol zijn.

Milestones van dit project zijn: robuuste sensoren, telemetrie, biocompatibiliteit, biofouling van de sensor, combinatie van deze factoren tot een robuust systeem voor lange termijn implantatie in vrijbewegende dieren en/of mensen.

De technieken voor electrofysiologie zijn voldoende ontwikkeld binnen Brains On-Line en zullen altijd worden toegepast als bestaande techniek. De techniek

valt uiteen in drie gebieden (deze moeten worden gezien als aangeboden platforms en niet als opvolgende toepassingen). Deze gebieden zullen hieronder apart beschreven worden, alsook de mogelijkheden tot het verder ontwikkelen binnen de techniek. De toegepaste techniek is afhankelijk van de vraagstelling bij de test-stof. De milestones voor deze experimenten zijn de behaalde resultaten per potentieel nieuw geneesmiddel.

In-vivo single unit electrofysiology: met deze techniek kan het effect van (nieuwe) geneesmiddelen op de vuurfrequentie van individuele cellen worden gemeten. De toegediende stof kan door interactie met receptoren op de cel of op gekoppelde cellen een verandering in vuurfrequentie van die cel veroorzaken. Deze verandering is dan een indicatie voor een verandering in uitstoot van de betrokken neurotransmitter. Door bekende agonisten of antagonistische van een specifieke receptor te gebruiken kan het effect van de interactie worden omgekeerd, daarmee is het mogelijk om het werkingsmechanisme van een stof te verifiëren. Door het uitvoeren van zogenaamde tract metingen, waarbij de electrode van boven naar beneden door een bepaald hersengebied wordt geleid kan ook worden gekeken naar het aantal en type cel (op basis van vuurfrequentie) dat door een stof wordt beïnvloed. De methode wordt sinds 2005 uitgevoerd bij Brains On-Line op zowel ratten als muizen.

LTP: Meer recent zijn we begonnen met het meten van zogenaamde LTP effecten, waarbij wordt gekeken naar het effect van stoffen op het versterken of remmen van bepaalde neuronale connecties in de hersenen. Op dit moment wordt hierbij vooral gekeken naar pathways betrokken in cognitie, het is mogelijk om aan te tonen dat bepaalde stoffen die in gedrag onderzoek de cognitie versterken of verminderen ook invloed hebben op de communicatie tussen bepaalde cel clusters in de hersenen. Dit is te meten, doordat ten opzichte van een controle groep er een sterkere of minder sterke koppeling is tussen de stimulatie met een specifieke frequentie en de amplitude van de postsynaptische response. Door LTP testen kan het werkingsmechanisme en de effectiviteit van een nieuwe geneesmiddel worden bepaald. De methode wordt momenteel alleen uitgevoerd in ratten maar zou ook interessant kunnen zijn om te ontwikkelen in muizen omdat veel genetische modellen in muis beschikbaar zijn. Daarnaast willen we de mogelijkheid onderzoeken om de techniek ook op andere cel clusters toe te passen om bijvoorbeeld effecten van de ziekte van Parkinson te bestuderen.

Spinal cord neuron en electromyography: Deze technieken focussen op zeer specifieke neuronen, maar zijn in essentie vergelijkbaar met de bovenbeschreven technieken. De reden om ze apart te noemen is dat de locatie van de neuronen erg specifiek is en dit een separate beschrijving van de biotechnische handelingen vereist. De technieken zijn ontwikkeld om te kijken naar geneesmiddelen die neuroprotectief werken of fysieke schade kunnen herstellen. Als laatste, zou het mogelijk kunnen zijn om met deze technieken de effecten van pijnstillers op de perifere neuronen betrokken bij de pijnsignaling te kwalificeren.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Ontwikkeling van nieuwe microsensoren
2	Toepassen van bestaande microsensoren
3	Doorontwikkelen van gevalideerde microsensoren
4	Single cell electrophysiology
5	Long Term Potentiation / Long Term Depression
6	Spinal cord electropfysiology en electromyography
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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

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

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor de farmacologische karakterisatie van nieuwe geneesmiddelen zijn verschillende technieken beschikbaar, deze technieken hebben hun eigen beperkingen, een van de belangrijkste voordelen van de toepassing van biosensoren is dat ze een zeer goede tijdresolutie hebben (milliseconde range) en ook dat ze zeer klein zijn (5-200 micrometer). De variatie van detecteerbare biomarkers voor ziektes (van het centraal zenuw stelsel) is relatief groot, dat maakt potentiële toepassingsgebieden groot. Een belangrijke uitdaging is echter het vinden van biologisch actieve moleculen (bijvoorbeeld: enzym, antibody of DNA) die specifiek zijn voor de detectie van één biomarker. Daarnaast moet de interactie tussen het biologisch actieve molecuul en de biomarker resulteren in een verandering van elektronische eigenschappen (bijvoorbeeld het vrijkomen van elektronen of verandering van een weerstand). Het onderliggende

systeem van het versterken en meten van een electronstroom is relatief universeel. Toch is het van groot belang dat voor alle biosensoren grondig vooronderzoek plaats vindt. Allereerst moet een passend biologisch actief molecuul gevonden worden bij de biomarker, dan moet er een goede bron worden gevonden voor dit molecuul. Het molecuul moet stabiel genoeg zijn om op een electrode gecoat te worden en enkele dagen tot maanden zijn activiteit weet te behouden.

Alvorens over te gaan op in-vivo toepassingen moet een nieuwe sensor uitgebreid in-vitro worden getest: is er inderdaad een stochastische omzetting (geeft een hogere bad concentratie van de biomarker een hoger signaal)? Zijn er potentieel interfererende stoffen of tussenproducten die ook een signaal afgeven? Is de gevoeligheid van de sensor voldoende om fysiologisch relevante concentraties en veranderingen daarin te detecteren? Pas wanneer deze vragen positief beantwoord kunnen worden is het zinvol over te gaan tot het in-vivo testen van de sensoren. In-vivo metingen zijn er in eerste instantie op gericht om de in-vitro data te herhalen, in de totale fysiologie van levende organismen zijn toch vaak nog interfererende signalen van andere biomoleculen of elektrische signalen die het lastig maken om in-vivo relevante metingen te kunnen uitvoeren. Indien dit het geval is is het nodig om het design van de sensor te heroverwegen. Het is mogelijk om de biomolecuulcoating in verschillende lagen uit te voeren waardoor permeabiliteit van verschillende moleculen differentieel wordt gereguleerd, waardoor interferentie wordt verminderd.

Wanneer er sprake is van een goed meetbaar signaal, dat duidt op een fysiologisch relevante concentratie van de biomarker, is het mogelijk om de concentratie van die biomarker te beïnvloeden. Dit kan door lokaal toedienen van een kleine hoeveelheid vloeistof met de betrokken biomarker, of door farmacologische beïnvloeding, afhankelijk van de te testen biomarker. Indien de read-out van de sensor een relevante concentratie verandering weerspiegelt kan de ontwikkeling van de sensor als succesvol worden beschouwd. De sensor is dan klaar voor toepassing in meer routinematig in-vivo onderzoek.

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.

Voor dit type experimenten worden dieren onder anesthesie gebracht (inhalatieanesthesie), op de locatie waar de sensor moet worden ingebracht wordt een zo klein mogelijke incisie gemaakt. Het doelgebied van de sensor wordt toegankelijk gemaakt, ofwel door de vorming van een (sub-cutane) pocket of door het boren van een kleine opening in de dorsale zijde van de schedel. Afhankelijk van de locatie wordt ook gewerkt met een vloeibaar of gelvorming topicale analgeticum. Nadat voldoende tijd is verstreken voor het locale analgeticum om werkzaam te zijn wordt de sensor ingebracht. Zodra de sensor op de juiste locatie zit wordt deze vastgezet om signaalverstoring door beweging tegen te gaan. Na het meten van een stabiele baseline waarde (dit kan een aantal uren duren) worden één of meerdere toedieningen lokaal of systemisch gegeven die de biomarker concentratie moeten beïnvloeden, om de werking van de sensor in-vivo te testen. Dit kan de biomarker zelf zijn, maar ook een bekende stof die de biomarker specifiek beïnvloed (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend een PDE inhibitor voor het meten van cyclische nucleotiden). Indien de toediening succesvol is geweest kan het experiment worden beëindigd. Dit vindt altijd plaats door het toedienen van een overdosis pentobarbital in de bloedbaan. In veel gevallen wordt ook dan nog met de sensor doorgemeten, omdat toediening van barbituraten ook als een vorm van farmacologische beïnvloeding kan worden beschouwd. Na afloop van het experiment wordt de sensor zo goed mogelijk vrijgeprepareerd om de locatie van de tip vast te kunnen stellen en eventuele effecten van de sensor op het omliggende tissue te meten. Voor een deel van de uit te voeren experimenten kan het zinvol zijn om een jugularis vene catheter aan te leggen om bloedmonster bij het dier af te nemen. Deze wordt volgens een standaard procedure aangebracht voordat de sensor wordt aangebracht. De bloedmonsters worden gebruikt om parallel aan de sensor bepaling een analyse te kunnen doen van de concentratie van de biomarker of de test-stof gebruikt voor de farmacologische beïnvloeding.

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

Aangezien het in deze experimenten om validatie gaat zijn 3-5 dieren per biomarker voldoende om vast te stellen dat een sensor in-vivo geschikt is. Door uitgebreide testen in-vitro wordt het aantal in-vivo experimenten tot een minimum beperkt. In de in-vitro test wordt in een bekersglas gekeken of de sensor de biomarker van interesse kan detecteren in een fysiologisch relevante concentratie. Tevens worden bekende competitieve biomarkers getest, om zeker te zijn dat deze in fysiologische concentraties geen signaal geven. Het is van belang om te zien dat een bepaalde sensor reproduceerbaar kan worden ingezet,

daarom is een minimum van 3 herhaalde succesvolle experimenten per sensor nodig. In een enkel geval zal een in-vitro geteste sensor in-vivo onverwachte signalen oppikt, in dat geval zal er een nieuwe sensor moeten worden ontwikkeld in-vitro waarbij door toepassing van coating een betere specificiteit wordt bewerkstelligd. Voor het oorspronkelijke design zullen in een dergelijk geval minder dieren nodig zijn, maar voor het nieuwe design weer 3-5 dieren. Tevens zou het mogelijk kunnen zijn dat er meer dieren nodig zijn, bijvoorbeeld als er in de kleine geteste groep sprake zou zijn van een sub-populatie. Mogelijk zouden deze dieren echter moeten worden gebruikt onder de dierproefbeschrijving van de toepassing van de bestaande microsensoren (beschrijving 2), omdat het bestaan van dergelijke sub-populaties natuurlijk geen invloed heeft op de werkzaamheid van een sensor.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt gebruik gemaakt van wild-type (niet transgene) ratten of muizen. In principe worden ratten gebruikt aangezien de doelstructuren groter zijn en daarmee makkelijker bereikbaar. Van muizen zal alleen gebruik worden gemaakt wanneer deze in een mogelijke vervolgstudie (zoals beschreven in bijlage 2 of een andere farmacologische studie bij de opdrachtgever) zouden worden gebruikt. De keuze voor muizen kan ook afhankelijk zijn van de beschikbaarheid van soort-specifieke informatie van de te testen farmaca (bijvoorbeeld toxicologie) en/of de beschikbaarheid van transgene muis-modellen die in een vervolgstudie ingezet zouden kunnen worden. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, in alle gevallen zal gebruik worden gemaakt van jong volwassen dieren, aangezien dit de meest voorkomende standaard groep is waaraan geneesmiddelen onderzoek wordt uitgevoerd. Geschatte aantallen: wij verwachten in de komende 5 jaar maximaal 20 verschillende nieuwe sensor ontwerpen te gaan ontwikkelen voor verschillende biomarkers. Met een groepsgrootte van 5 dieren per biomarker en een slagingspercentage van 80% (gebaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven; hierbij zijn technische problemen met de sensor tijdens het experiment en complicaties tijdens de ingreep de belangrijkste oorzaken) zou het om een totaal aantal van $5 * 20 / 0.8 = 125$ dieren gaan.

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.

Aangezien de uiteindelijke toepassing van de sensoren is gebaseerd op de wettelijke eis dat nieuwe geneesmiddelen worden getest in levende dieren is het onontkoombaar dat deze experimenten worden uitgevoerd in levende dieren. Vervanging in dit stadium van de experimenten is niet mogelijk aangezien de toepassing van deze sensoren gericht is op fysiologische processen in intacte levende wezens. Het complexe samenspel van de verschillende biomoleculen in

het lichaam maken dat verstoringen die niet in de in-vitro test zijn waargenomen toch zorgen voor een verstoring van het signaal. Farmacologische beïnvloeding van de biomarker verschilt vaak ook tussen het intacte wezen en ex-vivo metingen (kinetiek en metabolisering van stoffen). Elk model waarbij dus niet de totale fysiologie van het organisme wordt meegenomen vergroot het risico op falen van het meetsysteem in vervolg stappen en uiteindelijk bij de translationele waarde van de metingen voor nieuwe geneesmiddelen.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. Aan de vermindering van het aantal dieren wordt gewerkt door de uitgebreide voorscreens van de mogelijke sensoren. Als deze in-vitro niet laten zien dat ze een goede selectiviteit of gevoeligheid hebben worden ze niet toegepast in levende dieren. Daarnaast zal per sensor type worden gekeken naar de robuustheid van de meting van basale waarden, om zo tot een goed oordeel te kunnen komen of na 3 dieren kan worden gesproken van een functionele sensor. Verfijning van de experimenten vindt plaats doordat elke sensor voor en na toepassing in-vivo wordt gecalibreerd. Als de sensor bij pre-calibratie niet voldoet aan de kwaliteitseisen zal deze niet worden ingezet in een in-vivo experiment. Anesthesie wordt pas ingeleid nadat een positief resultaat uit de pre-calibratie is behaald. Verdere verfijning zit in de wijze van inbrengen van de sensor, door goede overweging van de locatie, het maken van een passend ontwerp voor die locatie en training van de uitvoerende biotechnicus voor de bijbehorende operatieve ingreep kan de experimentele afloop worden geoptimaliseerd. Afweging van de te gebruiken farmaca en biomarker zijn ook belangrijk voor het optimaal in-vivo testen van een sensor. De laatste mogelijkheid tot verfijning is het inbrengen van een tweede sonde die de met de sensor gemeten waarden kan valideren, of die gebruikt kan worden om de kinetiek van de toegepaste stof te bepalen. Dit is uiteraard alleen mogelijk als een geschikte sonde en analyse methode beschikbaar is.

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.

Door deze experimenten uitsluitend onder anesthesie uit te voeren met toepassing van locale analgesie is de kans op pijn, lijden en angst tot een minimum gereduceerd. Tevens zijn de experimenten terminaal, waardoor ook negatieve gevolgen van het bijkomen uit de anesthesie worden vermeden. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

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.

Door uitgebreid literatuuronderzoek en bezoek aan internationale bijeenkomsten wordt zorggedragen voor een zo up-to-date mogelijke kennis van het veld. Veel microsensoren worden in-vitro ontwikkeld, maar halen zelden toepassing in-vivo, of blijken bij in-vivo toepassing niet functioneel. Deze kennis levert een grote bron van informatie over mogelijkheden. Door onze kennis van biocoating kunnen wij beschreven microsensoren optimaliseren voor in-vivo toepassingen.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer

de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het onder anesthesie uitvoeren van de terminale experimenten is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen verdere aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten. Binnen de organisatie is uitgebreide kennis en ervaring aanwezig over uitvoeren van experimenten onder stabiele lange termijn anesthesie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Niet van toepassing

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

Niet van toepassing

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.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment.

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

Zeer gering, minder dan 1%

K. Classificatie van ongerief

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

Terminaal

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling. Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de sensor op de juiste plaats was geïmplanteerd. Omdat hierbij het tissue rond het implantaat moet worden vrijgeprepareerd is het beter om dit post-terminaal te doen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

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.

Voordat een geneesmiddel mag worden toegepast in de kliniek moet eerst in-vivo worden gedemonstreerd dat het middel werkzaam en niet toxisch is. Waar mogelijk moet worden gestreefd een werkingsmechanisme te postuleren en eventuele specifieke acties. Voor de farmacologische karakterisatie van nieuwe geneesmiddelen zijn verschillende in-vivo technieken beschikbaar, deze technieken hebben hun eigen beperkingen, een van de belangrijkste voordelen van de toepassing van biosensoren is dat ze een zeer goede tijdsresolutie hebben (milliseconde range) en ook dat ze zeer klein zijn (5-200 micrometer). Deze eigenschappen maken de microsensoren zeer geschikt voor het monitoren van bijvoorbeeld neurotransmitters in de hersenen of bloedglucose waarden (relatief snelle processen in het lichaam). Ze worden dan ook wel beschouwd al de belangrijkste toekomstige methode voor analyse van biomarkers.

De experimenten die wij onder deze dierproeven willen uitvoeren hebben tot doel het meten van de effecten van nieuwe en referentie geneesmiddelen op concentraties van glutamaat, gamma-aminoboterzuur, acetylcholine, glucose, lactaat, pyruvaat, waterstofperoxide of ATP. Sensoren die succesvol zijn ontwikkeld onder volgnummer 1 van dit projectvoorstel zouden ook ingezet moeten kunnen worden voor deze experimenten. Metingen kunnen zowel in de hersenen als perifeer worden uitgevoerd.

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.

Voor dit type experimenten worden dieren onder anesthesie gebracht (inhalatieanesthesie of injectie anesthesie wanneer neurotransmitter systemen worden gemeten die door inhalatie anesthesie worden beïnvloed), op de locatie waar de sensor moet worden ingebracht wordt een zo klein mogelijke incisie gemaakt. Het doelgebied van de sensor wordt toegankelijk gemaakt, ofwel door de vorming van een (sub-cutane) pocket of door het boren van een kleine opening in de dorsale zijde van de schedel. Afhankelijk van de locatie wordt ook gewerkt met een vloeibaar of gelvorming topicale analgeticum. Nadat voldoende tijd is verstreken voor het locale analgeticum om werkzaam te zijn wordt de sensor ingebracht. Zodra de sensor op de juiste locatie zit wordt deze vastgezet om signaalverstoring door beweging tegen te gaan. Na het meten van een stabiele baseline waarde (dit kan een aantal uren duren) worden één of meer stoffen toegediend en wordt gekeken naar het effect van de toegediende stof of de biomarker concentratie. De toe te dienen stoffen zijn in dit geval ofwel een potentieel nieuw geneesmiddel waarvan de werking moet worden getest en/of een referentiestof die een bekende werking heeft waarmee de meting kan worden gevalideerd of waarvan de werking beïnvloed moet worden door interactie met de nieuwe stof. Afhankelijk van de kinetiek en de werkingsduur van de stof kan het experiment worden beëindigd. Dit vindt altijd plaats door het toedienen van een overdosis pentobarbital in de bloedbaan. In veel gevallen wordt ook dan nog met de sensor doorgemeten, omdat toediening van barbituraten ook als een controle kan worden beschouwd. Na afloop van het experiment wordt de sensor zo goed mogelijk vrijgeprepareerd om de locatie van de tip vast te kunnen stellen en eventuele effecten van de sensor op het omliggende tissue te meten. Voor een deel van de uit te voeren experimenten kan het zinvol zijn om een jugularis vene catheter aan te leggen om bloedmonster bij het dier af te nemen. Deze wordt volgens een standaard procedure aangebracht voordat de sensor wordt aangebracht. De bloedmonsters worden gebruikt om parallel aan de sensor bepaling een analyse te kunnen doen van de concentratie van de biomarker of de test-stof gebruikt voor de farmacologische beïnvloeding. Tevens wordt in sommige gevallen ook een microdialyse probe aangebracht waarbij de werking van de sensor ook locatie specifiek kan worden gevalideerd op twee niveaus:

- het meten van langere termijn effecten op de biomarker (algemene stijging van de concentratie gemeten met microdialyse, in vergelijking met zeer transiente effecten gemeten met de sensor)
- het meten van de concentratie van de teststof op de testlocatie (kinetiek)

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

Met behulp van een poweranalyse is het benodigde aantal dieren om een relevante statistische toets uit te kunnen voeren bepaald op 6 dieren. Ervaring met deze techniek tot nu toe heeft geleerd dat 72% van de experimenten succesvol kan worden afgerond. Hiervoor zijn technische problemen met de sensor tijdens het experiment, het feit dat deze techniek pas relatief recent is geïntroduceerd, complicaties tijdens de ingreep (waardoor verder meten niet mogelijk was (bijvoorbeeld humaan eindpunt) en het niet kunnen voltooien van het voorgenomen protocol (de periode van toediening + werkingsduur van de test-stof zijn niet volledig afgerond) de belangrijkste oorzaken. Geschatte benodigde aantal dieren per grope is daarom $100\%/72\% \times 6 \text{ dieren} = 8.3 = 9 \text{ dieren}$. Naar verwachting zal het aantal werkelijk benodigde dieren minder zijn omdat het uitval percentage zal in de toekomst zeker verminderen, zie hierover informatie onder D.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt gebruik gemaakt van ratten of muizen. In principe worden ratten gebruikt aangezien de doel structuren groter zijn en daarmee makkelijker bereikbaar. Van muizen zal alleen gebruik worden gemaakt wanneer deze in een mogelijke vervolgstudie (zoals een andere farmacologische studie bij de opdrachtgever) zouden worden gebruikt. De keuze voor muizen kan ook afhankelijk zijn van de beschikbaarheid van soort-specifieke informatie van de te testen farmaca (bijvoorbeeld toxicologie) en/of de beschikbaarheid van transgene muis-modellen die in een vervolgstudie ingezet zouden kunnen worden. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, leeftijden van de dieren kunnen variëren afhankelijk van de vraagstelling voor het betreffende geneesmiddel.

In veel gevallen zal worden gewerkt met gezonde jong volwassen dieren. In specifieke gevallen zouden we echter ook gebruik willen maken van een passend (genetisch) pathologie model voor de ziekte waartegen het geneesmiddel is gericht. Deze dieren ontwikkelen de relevante ziekte verschijnselen pas op oudere leeftijd. In een dergelijk geval zou ook van dieren in een ander levensstadium gebruik gemaakt kunnen worden. Voorbeelden van toepasselijke modellen zijn hieronder gegeven. Wij benadrukken echter dat zoals in de project aanvraag is vermeld, de sponsor om specifieke redenen om een ander passend model kan vragen voor een neurologische aandoening. In een dergelijk geval zouden wij ook andere modellen willen kunnen testen op basis van de bestaande protocollen. Hierbij mag het potentiële intrinsieke ongerief van het model de aangevraagde ongerief classificatie niet overstijgen. Toetsing van het intrinsieke ongerief zal gebeuren door de IvD met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Ziekte van Parkinson: 6-OH-DA lesie model is een model dat wij goed beheersen. Daarnaast zijn er verschillende algemeen gebruikte genetische modellen zoals de alpha-synuclein overexpressie muis.

Ziekte van Alzheimer: hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar: men moet denken aan muizen die amyloid precursor proteïne of presenilin mutaties tot expressie brengen. Eventueel zou ook een model dat een mutante vorm van het Tau eiwit tot (over-)expressie bruikbaar kunnen zijn.

Ziekte van Huntington: ook hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar. Momenteel hebben wij veel ervaring met het gebruik van de zogenaamde R6/2 muizen en de Q175 muizen. Beide muizen brengen het huntingtin eiwit tot expressie met glutamine repeats.

Geschatte totaal aantallen: wij verwachten in de komende 5 jaar maximaal 20 nieuwe of referentie stoffen te gaan testen. Met een groepsgrootte van 9 dieren per stof zou het om een totaal aantal van 180 dieren gaan.

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 van deze experimenten is niet mogelijk aangezien ze zijn gericht op het testen van geneesmiddelen in intacte levende organismen. Bij het testen van (nieuwe) farmaca is het van groot belang dat de normale fysiologie van het hele organisme wordt meegenomen, omdat de kinetiek van het molecuul in grote mate wordt bepaald door doorbloeding van de hersenen en andere organen, bovendien kan het zijn dat de stof in het lichaam een secundair effect levert (off-target effect), waardoor de in-vitro gemeten reactie niet plaatsvindt, wordt geremd of versterkt.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. De te gebruiken sensoren hebben vooraf hun werking bewezen (in de ontwikkelingsfase beschreven in dierproef beschrijving 1) en kunnen daarom veilig in-vivo worden toegepast. Verdere verfijning van de experimenten vindt plaats doordat elke sensor voor en na toepassing in-vivo wordt gecalibreerd. Als de sensor bij pre-calibratie niet voldoet aan de kwaliteitseisen zal deze niet worden ingezet in een in-vivo experiment. Anesthesie wordt pas ingeleid nadat een positief resultaat uit de pre-calibratie is behaald. Verfijning zit ook in de wijze van inbrengen van de sensor, door goede overweging van de locatie, het maken van een passend ontwerp voor die locatie en training van de uitvoerende biotechnicus voor de bijbehorende operatieve ingreep kan de experimentele afloop worden geoptimaliseerd. Verfijning/vermindering door het inbrengen van een tweede sonde die die gebruikt kan worden om lokaal de kinetiek van de toegepaste stof te bepalen (of de langere termijn effecten van de teststof) is ook mogelijk, in het verleden zou hiervoor een aparte groep dieren zijn ingezet. Verfijning en vermindering voor dit type experiment is ook mogelijk indien het uitval percentage kan worden gereduceerd, dat zal zeer waarschijnlijk gebeuren aangezien de methode steeds meer gaat lijken op andere standaard experimenten die bij Brains On-Line worden uitgevoerd met een microdialyse sonde, door het meer toepassen van de techniek krijgen medewerkers meer ervaring. Voor microdialyse is het uitval percentage inmiddels gedaald naar een percentage tussen de 15 en 20%.

De geplande experimenten eerste in samenwerking met een sponsor besproken, waarbij wordt gekeken op welke wijze de vraagstelling het best wordt beantwoord. Het experimentele ontwerp wordt zo aangepast dat het te testen aantal doseringen minimaal is, de experimenten gerandomiseerd en waar mogelijk geblindeerd uitgevoerd worden en voldoende (maar niet te veel) dieren worden getest om de vraagstelling te beantwoorden.

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.

Door deze experimenten uitsluitend onder anesthesie uit te voeren met toepassing van lokale analgesie is de kans op pijn, lijden en angst tot een minimum gereduceerd. Tevens zijn de experimenten terminaal, waardoor ook negatieve gevolgen van het bijkomen uit de anesthesie worden vermeden. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

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.

Op dit moment zijn er voor zover ons bekend geen bedrijven die op commerciële basis in-vivo sensing experimenten uitvoeren waarbij niveaus bovengenoemde neurotransmitter / signaalstoffen worden gemeten. De kans dat bij het testen van een nieuw geneesmiddel dus een duplicatie experiment wordt uitgevoerd is gering. Wel zal in veel gevallen aan het einde van een individueel experiment een bekende blocker, agonist of antagonist worden toegediend. Deze toediening dient voornamelijk om de metingen verder te valideren. Aangezien de toediening plaatsvindt voor of na de toediening van een nieuwe stof of een niet eerder getest vehicle is er geen sprake van een duplicatie.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het onder anesthesie uitvoeren van de terminale experimenten is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen verdere aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten, anders dan door nog mogelijk onbekende bijwerkingen van de teststof.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Onvolvoende kennis van het nieuwe geneesmiddel.

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

Voordat een nieuwe stof wordt getest wordt bij de sponsor van een project navraag gedaan over in-vitro en in-vivo studies waarbij de stof in vergelijkbare concentraties is toegediend. Deze informatie is niet altijd beschikbaar, maar wanneer deze beschikbaar is wordt hij meegenomen in het opstellen van het protocol.

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.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment.

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

Zeer gering, minder dan 1%

K. Classificatie van ongerief

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

Terminaal of matig. Matig ongerief wanneer gebruik wordt gemaakt van genetisch gemodificeerde dieren waarbij de modificatie intrinsiek matig ongerief veroorzaakt (modellen voor hersenaandoeningen zoals bijvoorbeeld, maar niet uitsluitend een model voor de ziekte van Huntington). Als er sprake is van intrinsiek ongerief door toepassen van een pathologisch model wordt in overleg met de IvD een classificatie opgebouwd die het niet overstijgen van de verwachte classificatie borgt.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling. Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de sensor op de juiste plaats was geïmplanteerd. Omdat hierbij het tissue rond het implantaat moet worden vrijgeprepareerd is het beter om dit post-terminaal te doen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="Doorontwikkelen van gevalideerde microsensoren"/> |

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.

Doorontwikkeling I: wireless sensing: voor deze experimenten is in eerste instantie ook een deel ex-vivo werk nodig. Hierbij moet worden gedacht aan het vinden van een juiste combinatie van een versterker en zender, die klein genoeg zijn om in proefdieren toegepast te worden, maar krachtig genoeg om een aantal dagen metingen mee te kunnen verrichten / data te verzenden (of eventueel op te slaan). Dergelijke zenders en versterkers zijn voldoende voorhanden, het is van belang om een goede voorselectie te maken. Met de voorgeselecteerde systemen kunnen eerst in-vitro testen worden gedaan voor toepassing in een dier. De toe te passen sensor is gebaseerd op de waterstofperoxide sensor die met een tweede enzymlaag op een specifieke biomarker kan worden toegepast.

Doorontwikkeling II: robuuste sensor: dezelfde waterstofperoxide gebaseerde sensor zal bij lange termijn toepassing (in dieren of mensen) bestand moeten zijn tegen fysieke belasting, maar moet ook worden beschermd tegen biodegradatie en biofouling en ook nog biocompatibel zijn. Voor deze ontwikkeling is het belangrijk om met goede materiaal kennis op zoek te gaan naar materialen die aan deze eisen voldoen. Voor veel materialen is in de literatuur (en uit eerder uitgevoerde proeven intern) al kennis beschikbaar, dus is het van belang om deze kennis te gebruiken. Voor deze toepassing worden de sensoren ook eerst in-vitro getest om te zien of de beoogde resultaten haalbaar zijn alvorens in dieren te gaan meten.

Doorontwikkeling III: lactaatsensor voor toepassing bij tijdens partus in de mens: deze sensor is gebaseerd op de bestaande lactaat sensor Brains On-Line en een in de mens gebruikte sonde voor het meten van electrocardiogrammen. Deze sensor zou op termijn het afnemen van bloed voor een lactaat test bij het nog ongebooren kind kunnen vervangen. Materiaal keuze is ook voor deze toepassing van groot belang voor het uitvoeren van in-vitro experimenten. Na de in-vitro experimenten kan de sensor op dieren toegepast worden.

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.

Voor dit type experimenten worden dieren onder anesthesie gebracht (inhalatieanesthesie), en een langwerkend analgeticum toegediend in het geval van bijkomen na de operatie. Op de locatie waar de sensor moet worden ingebracht wordt een zo klein mogelijke incisie gemaakt. Het doelgebied van de sensor wordt toegankelijk gemaakt, ofwel door de vorming van een (sub-cutane) pocket of door het boren van een kleine opening in de dorsale zijde van de schedel. Afhankelijk van de locatie wordt ook gewerkt met een vloeibaar of gelvormig topicaal analgeticum. Nadat voldoende tijd is verstreken voor het locale analgeticum om werkzaam te zijn wordt de sensor ingebracht. Zodra de sensor op de juiste locatie zit wordt deze vastgezet om signaalverstoring door beweging tegen te gaan.

Bij alle geplande doorontwikkelingen is het de bedoeling om de uiteindelijke toepassing te laten plaatsvinden in vrijbewegende (en normaal gedragende) dieren te meten. Dat betekent dat na plaatsen van de sensor de huidopening in het dier moet worden dichtgehecht en dat de dieren rustig moeten bijkomen uit de anesthesie. Wanneer de dieren volledig wakker zijn, en geen tekenen van ongerief vertonen, anders dan die te verwachten zijn na een dergelijke chirurgische ingreep, kunnen zij worden teruggeplaatst in hun kooi. Indien nodig worden de dieren verzorgd met extra ingeweekt voer en/of solid drink.

Voor de wireless sensing kan het nodig zijn om het dier van een tweede sub-cutane pocket te voorzien waarin de sterile telemetrische zender wordt geplaatst. Bij deze vorm van sensing is het mogelijk om één tot enkele dagen na operatie te beginnen met de metingen. Het dier merkt hiervan niets, aangezien de sensor communiceert met een basisstation dat zich in de buurt van de kooi bevindt. Voor het testen zal één of enkele keren een toediening moeten plaatsvinden om een respons te kunnen bepalen op een test-stof. Deze test-stof (in veel gevallen een referentie stof met bekende werking) moet een relevante farmacologische beïnvloeding van het te bestuderen systeem geven (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend insuline bij het ontwikkelen van een glucose sensor). Na maximaal 10 weken zal het dier wederom onder anesthesie worden gebracht en worden getermineerd, de sensor kan vervolgens worden verwijderd voor post-calibratie en hergebruik van de zender.

Testen van de robuustheid (biologische houdbaarheid) van de sensor zal op vergelijkbare wijze gebeuren. In dit geval kan het zijn dat er gewerkt wordt met een sensor die met bedrading is verbonden. Het dier zal dan gedurende de dag voor enkele uren aan de meetapparatuur worden aangesloten. Hierbij zal de bewegingsvrijheid van het dier niet worden aangetast. Aansluiten zal op meerdere tijdstippen gebeuren over een periode van maximaal 2 maanden. Op deze dagen is het zinvol om de dieren ook een farmacologische behandeling te geven om de werking van de sensor te testen. Aan het einde van de metingen zal het dier onder anesthesie worden getermineerd, en een post-calibratie zal moeten uitwijzen in hoeverre de sensor minder gevoelig is ten opzichte van de gevoeligheid bij aanvang van de experimenten, gezien er wordt gewerkt met biologisch actieve stoffen. Het omringende tissue moet worden gechecked op tekenen van irritatie/inflammatie of inkapseling.

Voor doorontwikkeling III zullen experimenten alleen onder anesthesie worden uitgevoerd zoals beschreven in beschrijving dierproeven 2. Na het meten van een stabiele baseline waarde (dit kan een aantal uren duren) worden één of meer stoffen toegediend en wordt gekeken naar het effect van de toegediende stof of de biomarker concentratie. Afhankelijk van de kinetiek en de werkingsduur van de stof kan het experiment worden beëindigd.

Alle terminaties vinden plaats door het toedienen van een overdosis pentobarbital in de bloedbaan. Na afloop van het experiment wordt de sensor zo goed mogelijk vrijgeprepareerd om de locatie van de tip vast te kunnen stellen en eventuele effecten van de sensor op het omliggende tissue te meten. Voor een deel van de uit te voeren experimenten kan het zinvol zijn om een jugularis vene catheter aan te leggen om bloedmonster bij het dier af te nemen. Deze wordt volgens een standaard procedure aangebracht voordat de sensor wordt aangebracht. De bloedmonsters worden gebruikt om parallel aan de sensor bepaling een analyse te kunnen doen van de concentratie van de biomarker of de test-stof gebruikt voor de farmacologische beïnvloeding. Tevens wordt in sommige gevallen ook een microdialyse probe aangebracht waarbij de werking van de sensor ook locatie specifiek kan worden gevalideerd op twee niveaus:

- het meten van langere termijn effecten op de biomarker (algemene stijging van de concentratie gemeten met microdialyse, in vergelijking met zeer transiente effecten gemeten met de sensor)
- het meten van de concentratie van de teststof op de testlocatie (kinetiek)

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

Zoals bij de oorspronkelijke ontwikkeling van de sensoren (uit beschrijving proefdieren deel 1) zullen de resultaten van deze experimenten meer kwalitatief dan kwantitatief van aard zijn. Het gaat hierbij om een proof of principle voor een verfijnd systeem om een meting te kunnen verrichten. Het is van belang om te zien dat een bepaalde sensor reproduceerbaar kan worden ingezet, daarom is een minimum van 3 herhaalde succesvolle experimenten per sensor nodig. In een enkel geval zal een in-vitro geteste sensor in-vivo niet functioneel blijken te zijn, in dat geval zal er een nieuwe sensor moeten worden ontwikkeld in-vitro waarbij door toepassing van andere materialen / constructie / zend apparatuur een beter resultaat wordt behaald. Voor het oorspronkelijke design zullen in een dergelijk geval minder dieren nodig zijn, maar voor het nieuwe design weer 3-5 dieren. Wanneer een bepaald sensor ontwerp effectief lijkt te werken kan het worden ingezet in meer routine matige experimenten zoals beschreven onder proefdier beschrijving 2. Hiervoor zal wel een nieuwe beschrijving proefdieren of zelf een nieuwe aanvraag moeten worden ingediend.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt gebruik gemaakt van wild-type (niet transgene) ratten, alleen indien de doorontwikkelde sensoren zich hebben bewezen voor lange termijn metingen in vrijbewegende dieren, is het zinvol om een eventuele aanvraag te schrijven waarin de sensoren worden getest in muizen. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, in alle gevallen zal gebruik worden gemaakt van jong volwassen dieren. Geschatte totaal aantallen: wij verwachten in de komende 5 jaar maximaal 10 kandidaat systemen te vinden waarmee telemetrisch gemeten kan worden. Voor de lange termijn studies zullen meerdere groepen moeten worden getest, tijdpunten van 1, 2, 4 en 8 weken na implantatie, materialen zullen in de regel vooral voor biocompatibiliteit of voor geringe biofouling geschikt zijn, ervan uitgaande dat we tot 3 verschillende materiaal combinaties zouden willen testen gaat het in dit geval om 24 condities. Als laatste verwachten we voor de lactaat sensor met maximaal 4 prototypen in-vivo te willen testen. In totaal dus $(10+24+4) \cdot 38$ groepen met 5 dieren en een slagingspercentage van 80% (gabaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven; hierbij zijn technische problemen met de sensor tijdens het experiment en complicaties tijdens en na de ingreep de belangrijkste oorzaken) zou het om een totaal aantal van $5 * 38 / 0.8 = 238$ dieren gaan.

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.

Aangezien de uiteindelijke toepassing van de sensoren is gebaseerd op de wettelijke eis dat nieuwe geneesmiddelen worden getest in levende dieren is het onontkoombaar dat deze experimenten worden uitgevoerd in levende dieren. Vervanging in dit stadium van de experimenten is niet mogelijk aangezien de toepassing van deze sensoren is gericht op fysiologische processen in intacte levende wezens. Het complexe samenspel van de verschillende biomoleculen in het lichaam maken dat verstoringen die niet in de in-vitro test zijn waargenomen toch zorgen voor een verstoring van het signaal. Farmacologische beïnvloeding van de biomarker verschilt vaak ook tussen het intacte wezen en ex-vivo metingen (kinetiek en metabolisering van stoffen). Elk model waarbij dus niet de totale fysiologie van het organisme wordt meegenomen vergroot het risico op falen van het meetsysteem in vervolg stappen. Een telemetrisch systeem waarmee fysiologisch relevante parameters worden gemeten kan alleen zinvol worden getest in een levend dier. Biocompatibiliteit en biofouling is ook alleen goed te testen in een levend dier, als in parallel fysiologische parameters gemeten moeten worden. De perinatale lactaatsensor kan grotendeels ex-vivo worden getest, maar voor toepassing in de humane geneeskunde zal tenminste de werking éénmaal moeten worden gedemonstreerd in levende dieren.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. Aan de vermindering van het aantal dieren wordt gewerkt door de uitgebreide voorscreens van de mogelijke sensoren, en het waar mogelijk combineren van de experimenten, aangezien ook bij een telemetrische zender de fysieke belasting al aanwezig zal zijn. Voorscrenen van de juiste systemen en materialen is van groot belang om de toepassing in-vivo zo zinvol mogelijk te kunnen testen. In gevallen waar na drie dieren duidelijk is of de gekozen oplossing in-vivo werkt of niet kan de groepsgrootte tot 3 worden beperkt.

Verfijning van de experimenten vindt plaats doordat elke sensor voor en na toepassing in-vivo wordt gecalibreerd. Als de sensor bij pre-calibratie niet voldoet aan de kwaliteitseisen zal deze niet worden ingezet in een in-vivo experiment. Anesthesie wordt pas ingeleid nadat een positief resultaat uit in-vitro de pre-calibratie is behaald. Verdere verfijning zit in de wijze van inbrengen van de sensor, door goede overweging van de locatie, het maken van een passend ontwerp voor die locatie en training van de uitvoerende biotechnicus voor de bijbehorende operationele ingreep kan de experimentele afloop worden geoptimaliseerd. Een van de beoogde ontwikkelingen is het maken van een sensor die op zeer vergelijkbare wijze kan worden ingebracht als een microdialyse probe, een techniek waar al vele jaren ervaring mee is. Verdere verfijning zit in de mogelijkheid om in de toekomst te gaan werken aan een algoritme dat de stabilisatie van de sensor kan voorspellen. Hierdoor zal het niet langer nodig zijn om te wachten tot een sensor volledig is gestabiliseerd, maar kan op basis van het algoritme de basislijn worden geëxtrapoleerd, en effecten daarboven worden bepaald.

Verfijning van de protocollen uitgevoerd in het kader van de "biologische houdbaarheid" kan worden gezocht in het tijdig beëindigen van een experiment

waarbij de sensor niet meer functioneel is voor het beoogde einde van het experiment. Door zo kort mogelijk na het uitvallen van de sensor te kijken waardoor deze niet meer werkt zal het meest accurate beeld ontstaan waarop een ontwerp voor een volgende sensor kan worden gebaseerd.

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.

Waar mogelijk worden deze experimenten alleen uitgevoerd bij dieren onder anesthesie. Wanneer het toepassing onder wakkere condities nodig is worden dieren dagelijks gemonitord. Hierbij wordt gekeken naar wond-genezing, algemeen herstel na operatie, gewicht van het dier en algemene uiterlijke kenmerken van pijn, lijden of angst. Op basis van tot nu toe uitgevoerde experimenten beperkt ongerief zich tot herstel na de operatie en worden er geen nadelige gevolgen geobserveerd van de aanwezigheid van de sensor. Toegepaste materialen in het kader van de biofouling en biocompatibiliteit worden uitsluitend gebruikt wanneer zij in de literatuur zijn beschreven als geschikte materialen voor humane toepassingen. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

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.

Door uitgebreid literatuuronderzoek en bezoek aan internationale bijeenkomsten wordt zorggedragen voor een zo up-to-date mogelijke kennis van het veld. Veel microsensoren worden in-vitro ontwikkeld, maar halen zelden toepassing in-vivo, of blijken bij in-vivo toepassing niet functioneel. Deze kennis levert een grote bron van informatie over mogelijkheden. In een zeer beperkt aantal gevallen zijn sensoren ook in vrij bewegende dieren toegepast, de hier genoemde aandachtspunten zijn ook in de literatuur beschreven, maar tot op heden is er geen complete oplossing gevonden. In zekere zin is hier dan ook sprake van een stuk fundamenteel onderzoek waarbij kennis uit de materiaalkunde, biomechanica en protese geneeskunde kan worden gebruikt om nieuwe oplossingen te vinden voor het maken van een in vrij bewegende dieren en mensen werkende sensor.

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.

Een deel van de metingen zal moeten plaatsvinden op dieren die individueel zijn gehuisvest. Brains On-Line heeft echter een uniek huisvestings-systeem ontwikkeld waarbij dieren visueel, auditief en olfactorisch contact hebben met elkaar, maar elkaar niet fysiek kunnen benaderen. Waar mogelijk zal dit systeem worden toegepast. In het verleden is namelijk gebleken dat de dieren bij elkaar juist op de plaats van het implantaat gaan knagen, dit kan leiden tot onnodige beschadiging van het implantaat.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Voor de experimenten onder anesthesie geldt dat deze terminaal zijn en is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten. Dieren die bijkomen na de operatie zullen van het bijkomen en van de operatie zelf stress ondervinden. Pijn die gepaard gaat met het herstel na de uitgevoerde operatie wordt adequaat bestreden met een analgesie protocol. In het geval van langzaam herstel na een zware of langdurige operatie (hier niet voorzien) is het mogelijk om de dieren op basis van een pampering protocol op krachten te laten komen. Het loskomen van de sensor zou gevolgen kunnen hebben voor het welzijn van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het dier zou de wond door aanraking of knagen kunnen openen, of gebruikte lijm (bij een sensor in de hersenen) zou niet bestnad zijn tegen fysieke belasting. Hierdoor zou de sensor los kunnen komen.

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

Voorkomen van wond irritatie door besmetting, plaatsing van de sensor op een fysiek onbereikbare plaats, geen randen/spitse voorwerpen in de kooi. Operaties worden uitgevoerd onder op basis van een standaard aseptiek protocol onder schone condities. De lijmen die worden toegepast worden al sinds jaren toegepast voor het vastzetten van microdialyseprobes.

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.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment. Het loskomen van de sensor, gepaard gaand met grote verwondingen. Algehele slechte conditie van het dier na operatie (scoring op basis van gewicht, vacht, oogkleur en huidskleur en eventueel lichaamstemperatuur). Termineren als de sensor niet meer functioneel is, zodat mogelijk informatie kan worden verkregen over de oorzaak hiervan

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

Minder dan 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.

Matig, alle operatieve ingrepen veroorzaken matig ongerief dat alleen kan worden bestreden maar niet kan worden voorkomen. Uiteraard wordt door toepassing van complete anesthesie en analgesie geprobeerd de gevolgen te minimaliseren.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling (met uitzondering van de dieren waarbij wordt gekeken naar lange termijn effecten van de implantatie en de telemetrische sensor). Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de sensor op de juiste plaats was geïmplanteerd en of deze eventueel schade of reactie heeft opgewekt. Omdat hierbij het tissue rond het implantaat moet worden vrijgeprepareerd is het beter om dit post-terminaal te doen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="4"/> | <input type="text" value="Single cell electrophysiology"/> |

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.

Neuropsychiatrische aandoeningen, waaronder depressie, angst, psychose, verslaving, ziekten van Parkinson, Alzheimer en Huntington, hebben hun oorsprong in het centraal zenuwstelsel en hebben invloed op emotie, cognitie en gedrag van mensen. Een laatste belangrijke groep van aandoeningen zijn de neurodegeneratieve aandoeningen waarbij door afsterven van neuronen naast emotionele en cognitieve ook motorische problemen kunnen optreden. Al deze ziekten van het centraal zenuw stelsel vormen een grote medische uitdaging, naar schatting 25% van de wereldbevolking krijgt te maken met een neurologische aandoening tijdens zijn of haar leven. Volgens de WHO is het de op een na grootste reden voor uitval uit een normaal bestaan in de samenleving in geïndustrialiseerde landen.

Behandelingen voor neurologische aandoeningen zijn 60 jaar geleden begonnen met antidepressiva en antipsychotica. Door intensief onderzoek in de afgelopen 60 jaar zijn efficiëntere en veiligere middelen ontwikkeld met minder bijwerkingen. Drie belangrijke beperkingen van deze geneesmiddelen blijven bestaan: een gebrek aan goede response op therapie, de vertraagde werking van de middelen en het risico op terugval na stoppen van een behandeling. De huidige ontwikkeling van nieuwe farmaca richt zich op deze uitdagingen. Brains On-Line wil de ontwikkeling van nieuwe stoffen voor de kliniek ondersteunen door het aanbieden van onderzoeksplatforms voor nieuwe stoffen, waarbij ze kunnen worden getest tegen bestaande en werkzaam getoonde stoffen.

De hier aangevraagde proeven zijn erop gericht om veranderingen in veldpotentialen rond een individueel neuron op te pikken. Hierbij kunnen frequentie (en patroon), amplitude, lengte van individuele pulsen en of aantallen actief vurende cellen in één doorgang door een hersen gebied worden bepaald. Al deze parameters kunnen beïnvloed worden door farmaca die direct door aangrijpen op een receptor of kanaal, of indirect door dat de farmaca een secundaire transmitter doen vrijkomen die effect heeft. Door gebruik te maken van bekende receptor (ant)agonisten is het mogelijk om niet alleen de werkzaamheid, maar ook het werkingsmechanisme te bepalen. Ook is het mogelijk om parameters voor receptorbindings affiniteit te bepalen.

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

Dieren worden voor het experiment onder diepe, langdurige anesthesie gebracht (eventueel aangevuld met een analgeticum, wanneer deze pijler niet geborgd is door het anestheticum), afhankelijk van het neurotransmitter systeem dat zal worden bestudeerd wordt hiervoor inhalatie of een injectie anesthesie gebruikt. Daarna wordt een zo klein mogelijke incisie gemaakt op de schedel boven het hersengebied van interesse. Lokaal wordt analgesie toegepast voordat de schedel wordt vrijgeprepareerd en op de juiste plaats een klein gat wordt geboord waardoor de glazen electrode kan worden ingebracht. Terwijl het locale anestheticum kan inwerken worden er indien nodig voor verdere anesthesie of toediening van test-stoffen kanules in de staartvene, intraperitoneale ruimte, ventriculair of subcutaan ingebracht. Voor een deel van de uit te voeren experimenten kan het zinvol zijn om een jugularis vene catheter aan te leggen om bloedmonster bij het dier af te nemen. Deze wordt volgens een standaard procedure aangebracht voordat er gaten in de schedel worden geboord. De bloedmonsters worden gebruikt om een analyse te kunnen doen van de concentratie van de de test-stof in het bloed. Als alle voorbereidingen zijn voltrokken wordt het dier in een stereotactisch frame geplaatst ter voorbereiding op de metingen. De schedel van het dier wordt verbonden met de aarding van de meetapparatuur te verbinden, zodat alle gemeten potentialen worden gemeten ten opzichte van één en dezelfde nulwaarde. Het frame wordt gebruikt om in het gebied van interesse (waarvan de coördinaten zijn gebaseerd op een hersenatlas) een glazen pipet te laten zakken in de hersenen. De glazen pipet heeft een tipdiameter van enkele micrometers. Op de juiste diepte kunnen de elektrische ontladingen van neuronen worden gemeten. Op basis van ervaring en literatuur is het mogelijk om specifieke cellen te herkennen en de meting te starten.

Afhankelijk van de vraagstelling kan worden gekozen voor een farmacologische dose-finding of een cells per trackt design. Bij een dose-finding experiment wordt van één cel de basale vuurfrequentie bepaald en vervolgens de invloed van verschillende toedieningen van de te bestuderen stof (tegen een ziekte van het centraal zenuwstelsel (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend een potentieel antipsychoticum, antidepressivum), al dan niet in combinatie met een voor of na behandeling met een bekende (ant)agonist, om het werkingsmechanisme van de stof of het celtype te valideren. Bij een ander type vraagstelling kan de electrode langzaam door het gebied van interesse worden geleid, waarbij het patroon van de potentialen wordt bepaald. In dergelijke gevallen zal het dier vaak worden voorbehandeld met een nieuwe test stof tegen een ziekte van het centraal zenuwstelsel (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend een potentieel antipsychoticum, antidepressivum). Hierbij moeten dan ook controle experimenten met bekende stoffen en een vehicle worden meegenomen.

Nadat de informatie ten behoeve van het experiment compleet is wordt het dier getermineerd door een overdosis pentobarbital. De meting loopt ook dan door, omdat het vuren van de cel binnen korte tijd na het stoppen van het hart ook zou moeten stoppen. Het dier wordt ten alle tijden warm gehouden op een warmtemat en temperatuur regelmatig gecontroleerd. Vochtverlies door ademhaling en de aanwezigheid van een operatie wond op het hoofd wordt gecompenseerd door regelmatige toediening van subcutaan saline.

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

Op basis van een poweranalyse is de benodigde groepsgrootte berekend op 6 dieren, met een uitval van 25-30% (gebaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven; hierbij zijn technische problemen met de sensor tijdens het experiment, complicaties tijdens de ingreep en het niet kunnen voltooien van het voorgenomen protocol (de periode van toediening + werkingsduur van de test-stof zijn niet volledig afgerond) de belangrijkste oorzaken) is de praktijk dat 8 dieren voor elke te testen stof dosering nodig zijn. Het minimaliseren van het aantal dieren is vooral mogelijk door de uitval tijdens de experimenten te minimaliseren. Een andere belangrijke keuze is het te testen aantal doseringen, door deze te minimaliseren kan het aantal experimenten worden beperkt.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt gebruik gemaakt van ratten of muizen. In principe worden ratten gebruikt aangezien de doel structuren groter zijn en daarmee makkelijker bereikbaar. Van muizen zal alleen gebruik worden gemaakt wanneer deze in een mogelijke vervolgstudie (zoals een andere farmacologische studie bij de opdrachtgever) zouden worden gebruikt. De keuze voor muizen kan ook afhankelijk zijn van de beschikbaarheid van soort-specifieke informatie van de te testen farmaca (bijvoorbeeld toxicologie) en/of de beschikbaarheid van transgene muis-modellen die in een vervolgstudie ingezet zouden kunnen worden. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, leeftijden van de dieren kunnen variëren afhankelijk van de vraagstelling voor het betreffende geneesmiddel.

In veel gevallen zal worden gewerkt met gezonde jong volwassen dieren. In specifieke gevallen zouden we echter ook gebruik willen maken van een passend (genetisch) pathologie model voor de ziekte waartegen het geneesmiddel is gericht. Deze dieren ontwikkelen de relevante ziekte verschijnselen pas op oudere leeftijd. In een dergelijk geval zou ook van dieren in een ander levensstadium gebruik gemaakt kunnen worden. Voorbeelden van toepasselijke modellen zijn hieronder gegeven. Wij benadrukken echter dat zoals in de project aanvraag is vermeld, de sponsor om specifieke redenen om een ander passend model kan vragen voor een neurologische aandoening. In een dergelijk geval zouden wij ook andere modellen willen kunnen testen op basis van de bestaande protocollen. Hierbij mag het potentiële intrinsieke ongerief van het model de aangevraagde ongerief classificatie niet overstijgen. Toetsing van het intrinsieke ongerief zal gebeuren door de IvD met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Ziekte van Parkinson: 6-OH-DA lesie model is een model dat wij goed beheersen. Daarnaast zijn er verschillende algemeen gebruikte genetische modellen zoals de alpha-synuclein overexpressie muis.

Ziekte van Alzheimer: hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar: men moet denken aan muizen die amyloid precursor proteïne of presenilin mutaties tot expressie brengen. Eventueel zou ook een model dat een mutante vorm van het Tau eiwit tot (over-)expressie bruikbaar kunnen zijn.

Ziekte van Huntington: ook hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar. Momenteel hebben wij veel ervaring met het gebruik van de zogenaamde R6/2 muizen en de Q175 muizen. Beide muizen brengen het huntingtin eiwit tot expressie met glutamine repeats.

Geschatte totaal aantallen: wij verwachten in de komende 5 jaar rond de 25 nieuwe of referentie stoffen te gaan testen. Op basis van het aantal dieren gebruikt in de afgelopen 5 jaar (208) verwachten wij dat we maximaal 250 dieren nodig hebben voor deze experimenten.

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 van deze experimenten is niet mogelijk aangezien ze zijn gericht op het testen van geneesmiddelen in intacte levende organismen. Bij het testen van (nieuwe) farmaca is het van groot belang dat de normale fysiologie van het hele organisme wordt meegenomen, omdat de kinetiek van het molecuul in grote mate wordt bepaald door doorbloeding van de hersenen en andere organen, bovendien kan het zijn dat de stof in het lichaam een secundair effect levert (off-target effect), waardoor de in-vitro gemeten reactie niet plaatsvindt, wordt geremd of versterkt. Een klein deel van de experimenten zou vervangen kunnen worden door het uitvoeren van patch-clamp experimenten op individuele cellen die zijn verkregen uit een recent getermineerd dier. Op deze cellen is een deel van de werking van de test stof uit te zoeken, maar het geeft nog geen informatie over de dosering die in het intacte dier (en later de mens) nodig is om het beoogde effect te verkrijgen.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. Verfijning van deze experimenten is voornamelijk gericht op het lang stabiel onder anesthesie houden van de dieren, daarbij moet aandacht worden besteed aan lichaamstemperatuur, vochthuishouding en ademhaling (sfrequentie). Het voorbereiden van goede electrodes voor de experimenten en het regelmatig checken van de apparatuur is van groot belang om zeker te zijn dat de individuele experimenten op een goede manier plaatsvinden.

Vermindering voor dit type experiment is mogelijk indien het uitval percentage kan worden gereduceerd, dat zal zeer waarschijnlijk gebeuren aangezien de methode steeds meer routinematig wordt toegepast bij Brains On-Line.

Net als bij dierproef beschrijving 2 worden deze experimenten eerste in samenwerking met een sponsor besproken, waarbij wordt gekeken op welke wijze de vraagstelling het best wordt beantwoord. Het experimentele ontwerp wordt zo aangepast dat het te testen aantal doseringen minimaal is, de experimenten gerandomiseerd en waar mogelijk geblindeerd uitgevoerd worden en voldoende (maar niet te veel) dieren worden getest om de vraagstelling te beantwoorden.

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.

Door deze experimenten uitsluitend onder anesthesie uit te voeren met toepassing van locale analgesie is de kans op pijn, lijden en angst tot een minimum gereduceerd. Tevens zijn de experimenten terminaal, waardoor ook negatieve gevolgen van het bijkomen uit de anesthesie worden vermeden. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

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.

Door goede literatuur kennis over bestaande mechanismen en experimenten is het goed mogelijk om te voorkomen dat experimenten nodeloos worden gedupliceerd. In een enkel geval zal het nodig zijn om experimenten te herhalen om een methode te valideren alvorens deze in te zetten voor het testen van nieuwe geneesmiddelen. Bijkomend voordeel van de literatuuronderzoeken is dat nieuwe methoden die verfijning of vermindering kunnen ondersteunen worden herkend. De te testen nieuwe geneesmiddelen zijn in de meeste gevallen niet eerder in electrofysiologische experimenten getest, onderzoekspartners komen juist naar ons toe omdat dergelijke expertise daar niet in-huis beschikbaar is. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat experimenten duplicaties zijn.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het onder anesthesie uitvoeren van de terminale experimenten is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten. Belangrijkste uitdaging is eventuele overgang tussen inhalatie anesthesie en injectie anesthesie. Hierbij moet zeer zorgvuldig worden gemonitord dat dieren niet te ver uit narcose komen of te diep in de narcose wegzakken.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Over- of onderdosering van anestheticum

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

Ervaring van de uitvoerende medewerker en goede directe monitoring van de ademhaling van het dier en het zorgen voor de aanwezigheid van apparatuur voor beademing en monitoring van de zuurstofsaturatie van het bloed.

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.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment.

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

Zeer gering, minder dan 1%

K. Classificatie van ongerief

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

Terminaal of matig. Matig ongerief wanneer gebruik wordt gemaakt van genetisch gemodificeerde dieren waarbij de modificatie intrinsiek matig ongerief veroorzaakt (modellen voor hersenaandoeningen zoals bijvoorbeeld, maar niet uitsluitend een model voor de ziekte van Huntington). Als er sprake is van intrinsiek ongerief door toepassen van een pathologisch model wordt in overleg met de IvD een classificatie opgebouwd die het niet overstijgen van de verwachte classificatie borgt.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling. Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de electrode op de juiste plaats was geïmplanteerd in de hersenen, deze moeten dus na het experiment worden verwijderd. Voor de genetische gemodificeerde dieren geldt dat ook een stukje weefsel moet worden bewaard voor genotypering.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="5"/> | <input type="text" value="Long Term Potentiation / Long Term Depression"/> |

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.

Single-cell electrofysiologie (beschrijving dierproeven 4) is een methode om direct actie-potentialen van actief vurende neuronen te meten. Het meten van veldpotentialen van een cel populatie kan worden gebruikt om synaptische potentialen en de synaptische plasticiteit te meten. Voor het meten van effecten van potentiering is het van belang om het potentiaal te meten van een groot aantal cellen in een bepaald hersengebied. Door de potentialen te synchroniseren met een stimulus met een specifieke frequentie is het mogelijk om deze "groepspotentialen" te meten (population spike or population synaptic potential). Het gemeten signaal wordt ook wel EPSP genoemd (evoked population synaptic potential). Herhaling van de stimulatie kan lijden tot een vergroting of verkleining van de amplitude van de EPSP (respectievelijk: long term potentiation en long term depression) en is een maat voor synaptische

plasticiteit en onderliggende mechanismen voor geheugen en cognitie betrokken bij pathofysiologie en behandeling van cognitieve deficienties bij ouderdoms-ziekten, verslaving en neuropsychiatrische aandoeningen.

Doel van dit type experimenten is het testen van het effect van nieuwe geneesmiddelen op de 'long term potentiation' of 'depression'. Deze stoffen kunnen op deze manier worden getest op de versterking van cognitieve processen.

Zo hebben wij in het recente verleden de disruptie van LTP door scopolamine gevalideerd (deze stof is zowel in gedragstesten als in eerdere electrofysiologische testen bewezen als cognitie onderdrukkend) in ratten. Omgekeerd kan deze methode ook worden gebruikt om stoffen te testen die de cognitie versterken. Afhankelijk van de pre-synaptische stimulatie (frequentie en amplitude) zullen de post-synaptische potentialen worden geactiveerd, aanwezigheid van de cognitie versterkende of remmende stoffen zal de respons op de stimulatie gaan variëren.

In een typische studie zal worden gekeken naar het effect van een potentieel nieuw geneesmiddel alleen en in combinatie met een disrumperende stof zoals scopolamine (om te kijken of de disruptie kan worden omgekeerd). Daarnaast moeten passende controle experimenten worden uitgevoerd.

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

Dieren worden voor het experiment onder diepe, langdurige anesthesie gebracht (eventueel aangevuld met een analgeticum, wanneer deze pijler niet geborgd is door het anestheticum), afhankelijk van het pathway dat zal worden bestudeerd wordt hiervoor inhalatie of een injectie anesthesie gebruikt. Diepe anesthesie wordt geconstateerd met afwezigheid van voet of cornea reflex. Daarna wordt een zo klein mogelijke incisie gemaakt op de schedel boven het hersengebied van interesse. Lokaal wordt analgesie toegepast voordat de schedel wordt vrijgeprepareerd en op de juiste plaats een klein gat wordt geboord waardoor de glazen electrode kan worden ingebracht.

Terwijl het lokale anestheticum kan inwerken worden er indien nodig voor verdere anesthesie of toediening van test-stoffen kanules in de staartvene, intraperitoneale ruimte, ventriculair of subcutaan ingebracht. Voor een deel van de uit te voeren experimenten kan het zinvol zijn om een jugularis vene catheter aan te leggen om bloedmonster bij het dier af te nemen. Deze wordt volgens een standaard procedure aangebracht voordat er gaten in de schedel worden geboord. De bloedmonsters worden gebruikt om een analyse te kunnen doen van de concentratie van de de test-stof in het bloed. Als alle voorbereidingen zijn voltrokken wordt het dier in een stereotactisch frame geplaatst ter voorbereiding op de metingen. Op basis van schedel-orientatie punten (bregma/lambda) worden kleine openingen in de dorsale zijde van de schedel geboord boven specifieke hersengebieden op basis van een hersenatlas. De schedel van het dier wordt verbonden met de aarding van de meetapparatuur te verbinden, zodat alle gemeten potentialen worden gemeten ten opzichte van één en dezelfde nulwaarde.

Het dier wordt in het stereotactisch frame geplaatst en de stimulatie electrode(s) en de meetelectrode worden geïmplanteerd in de gebieden van interesse, de definitieve locatie wordt bepaald op basis van de response op de stimulatie(s). Als de juiste condities zijn vastgesteld waaronder de metingen kunnen plaatsvinden, worden de electrodes op hun plaats gelijmd met cyanoacrylaat lijm gevolgd door tandarts cement (voor de stabiliteit en afscherming van elektrische ruis). Hierna worden baseline EPSPs gemeten, verdere EPSPs worden gemeten na een korte applicatie van stimulatie met een specifieke frequentie. De effecten van plasticiteit modulerende geneesmiddelen (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend pro-cognitive stoffen) toegedient voor of tijdens de experimenten kunnen gemeten worden in vergelijking met een controle groep (vehicle toediening). De methode kan onder andere ook worden toegepast om van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen bijvoorbeeld ziektes van het centraal zenuw stelsel aan te tonen dat zij geen negatieve gevolgen hebben voor de plasticiteit. Eventueel kan gekozen worden voor meting van het effect op een LTP disrumperend of versterkend agens. Toedieningsroute: lokaal, i.v., i.p., s.c., i.c.v. of oraal.

Dieren worden tijdens de anesthesie inductie en het experiment warm gehouden op een warmtematje. Temperatuur, ademhaling(frequentie) en zuurstofsaturatie van het bloed worden regelmatig gecontroleerd. Tevens worden de dieren op regelmatige basis subcutaan saline toegediend om

dehydratatie te voorkomen.

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

Op basis van literatuurstudies, en power-analyses is voor een succesvol vergelijk bepaald dat bij deze experimenten 5 succesvolle metingen per groep nodig zijn. Met een een slagingspercentage van 80% (gebaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven; hierbij zijn technische problemen met de plaatsing en het lijmen van de electrode tijdens het experiment en complicaties tijdens de ingreep de belangrijkste oorzaken) is een groepsgrootte van 6-7 te verwachten. De experimenten duren steeds één volledige dag en kunnen in diezelfde dag worden geëvalueerd. Daarmee kan per dag worden bepaald of verdere dieren nodig zijn om een relevante meting te doen.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt gebruik gemaakt van ratten of muizen. In principe worden ratten gebruikt aangezien de doel structuren groter zijn en daarmee makkelijker bereikbaar. Van muizen zal alleen gebruik worden gemaakt mits wanneer deze in een mogelijke vervolgstudie (zoals een andere farmacologische studie bij de opdrachtgever) zouden worden gebruikt. De keuze voor muizen kan ook afhankelijk zijn van de beschikbaarheid van soort-specifieke informatie van de te testen farmaca (bijvoorbeeld toxicologie) en/of de beschikbaarheid van transgene muis-modellen die in een vervolgstudie ingezet zouden kunnen worden. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, leeftijden van de dieren kunnen variëren afhankelijk van de vraagstelling voor het betreffende geneesmiddel.

In veel gevallen zal worden gewerkt met gezonde jong volwassen dieren. In specifieke gevallen zouden we echter ook gebruik willen maken van een passend (genetisch) pathologie model voor de ziekte waartegen het geneesmiddel is gericht. Deze dieren ontwikkelen de relevante ziekte verschijnselen pas op oudere leeftijd. In een dergelijk geval zou ook van dieren in een ander levensstadium gebruik gemaakt kunnen worden. Voorbeelden van toepasselijke modellen zijn hieronder gegeven. Wij benadrukken echter dat zoals in de project aanvraag is vermeld, de sponsor om specifieke redenen om een ander passend model kan vragen voor een neurologische aandoening. In een dergelijk geval zouden wij ook andere modellen willen kunnen testen op basis van de bestaande protocollen. Hierbij mag het potentiële intrinsieke ongerief van het model de aangevraagde ongerief classificatie niet overstijgen. Toetsing van het intrinsieke ongerief zal gebeuren door de IvD met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Ziekte van Parkinson: 6-OH-DA lesie model is een model dat wij goed beheersen. Daarnaast zijn er verschillende algemeen gebruikte genetische modellen zoals de alpha-synuclein overexpressie muis.

Ziekte van Alzheimer: hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar: men moet denken aan muizen die amyloid precursor proteïne of presenilin mutaties tot expressie brengen. Eventueel zou ook een model dat een mutante vorm van het Tau eiwit tot (over-)expressie bruikbaar kunnen zijn.

Ziekte van Huntington: ook hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar. Momenteel hebben wij veel ervaring met het gebruik van de zogenaamde R6/2 muizen en de Q175 muizen. Beide muizen brengen het huntingtin eiwit tot expressie met glutamine repeats.

Geschatte totaal aantallen: Uitgaande van 1-2 complete experimenten van 4 groepen van ieder 7 dieren per jaar. verwachten wij maximaal $10 \times 28 = 280$ dieren te gaan gebruiken over de periode van de aanvraag.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging van deze experimenten is niet mogelijk aangezien ze zijn gericht op het testen van geneesmiddelen in intacte levende organismen (wettelijke eis). Bij het testen van (nieuwe) farmaca is het van groot belang dat de normale fysiologie van het hele organisme wordt meegenomen, omdat de kinetiek van het molecuul in grote mate wordt bepaald door doorbloeding van de hersenen en andere organen, bovendien kan het zijn dat de stof in het lichaam een secundair effect levert (off-target effect), waardoor de in-vitro gemeten reactie niet plaatsvindt, wordt geremd of versterkt.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. Verfijning van deze experimenten is voornamelijk gericht op het lang stabiel onder anesthesie houden van de dieren, daarbij moet aandacht worden besteed aan lichaamstemperatuur, vochthuishouding en ademhaling (sfrequentie). Het uitvoeren van de experimenten moet met de grootst mogelijke nauwkeurigheid plaatsvinden. Om onze kennis en kunde op peil te houden werken wij samen met één van de leidende academische instituten (Prof. M. Rowan) in het veld en hebben daar ook training ontvangen. Het voorbereiden van goede elektroden voor de experimenten en het regelmatig checken van de apparatuur is van groot belang om zeker te zijn dat de individuele experimenten op een goede manier plaatsvinden. Na plaatsing van de elektrode wordt vaak ook nog een stabiliteitstest uitgevoerd van 30 minuten, om zeker te zijn dat de elektrode op de juiste plaats wordt vastgelijmd.

Vermindering voor dit type experiment is mogelijk indien het uitval percentage kan worden gereduceerd, dat zal zeer waarschijnlijk gebeuren aangezien de methode steeds meer routinematig wordt toegepast bij Brains On-Line. Daarnaast biedt het dagelijks uitwerken van de data de mogelijkheid om te kijken of verdere experimenten nodig en zinvol zijn. Het gebruik van hetzelfde vehicle in verschillende experimenten biedt ook een mogelijkheid tot reductie.

Net als bij de beschrijvingen voor proeven 2 en 4 worden deze experimenten eerste in samenwerking met een sponsor besproken, waarbij wordt gekeken op welke wijze de vraagstelling het best wordt beantwoord. Het experimentele ontwerp wordt zo aangepast dat het te testen aantal doseringen minimaal is, de experimenten gerandomiseerd en waar mogelijk geblindeerd uitgevoerd worden en voldoende (maar niet te veel) dieren worden getest om de vraagstelling te beantwoorden.

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.

Door deze experimenten uitsluitend onder anesthesie uit te voeren met toepassing van locale analgesie is de kans op pijn, lijden en angst tot een minimum gereduceerd. Tevens zijn de experimenten terminaal, waardoor ook negatieve gevolgen van het bijkomen uit de anesthesie worden vermeden. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

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.

Door goede literatuur kennis over bestaande mechanismen en experimenten is het goed mogelijk om te voorkomen dat experimenten nodeloos worden gedupliceerd. In een enkel geval zal het nodig zijn om experimenten te herhalen om een methode te valideren alvorens deze in te zetten voor het testen van nieuwe geneesmiddelen. Bijkomend voordeel van de literatuuronderzoeken is dat nieuwe methoden die verfijning of vermindering kunnen ondersteunen worden herkend. De te testen nieuwe geneesmiddelen zijn in de meeste gevallen niet eerder in electrofysiologische experimenten getest, onderzoekspartners komen juist naar ons toe omdat dergelijke expertise daar niet in-huis beschikbaar is. Brains On-Line is voor zover wij weten de enige service provider wereldwijd die dit type experimenten in levende dieren kan doen. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat experimenten duplicaties zijn.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het onder anesthesie uitvoeren van de terminale experimenten is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen verdere aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten, anders dan door nog mogelijk onbekende bijwerkingen van de teststof.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Onvolvoende kennis van het nieuwe geneesmiddel.

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

Voordat een nieuwe stof wordt getest wordt bij de sponsor van een project navraag gedaan over in-vitro en in-vivo studies waarbij de stof in vergelijkbare concentraties is toegediend. Deze informatie is niet altijd beschikbaar, maar wanneer deze beschikbaar is wordt hij meegenomen in het opstellen van het protocol.

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.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment.

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

Zeer gering, minder dan 1%.

K. Classificatie van ongerief

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

Terminaal of matig. Matig ongerief wanneer gebruik wordt gemaakt van genetisch gemodificeerde dieren waarbij de modificatie intrinsiek matig ongerief veroorzaakt (modellen voor hersenaandoeningen zoals bijvoorbeeld, maar niet uitsluitend een model voor de ziekte van Huntington). Als er sprake is van intrinsiek ongerief door toepassen van een pathologisch model wordt in overleg met de IvD een classificatie opgebouwd die het niet overstijgen van de verwachte classificatie borgt.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling. Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de electrodes op de juiste plaats was geïmplanteerd. Omdat hierbij de hersenen moet worden vrijgeprepareerd is het beter om dit post-terminaal te doen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="6"/> | <input type="text" value="Spinal cord electrophysiology en electromyography"/> |

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.

Pijn is een klacht waar miljoenen mensen in de wereld mee moeten leven. Volgens het Center for Disease Control and Prevention (U.S.A.) zijn chronische en inflammatoire pijn de belangrijkste oorzaken van invaliditeit in de Verenigde staten. Chronische pijn komt (inclusief neuropathische pijn) komt voor in bijna 90% van patiënten met kanker en kan in veel gevallen niet adequaat behandeld worden. Oorzaken van neuropathische pijn zijn onder andere: diabetische neuropathie, zenuw beknellings syndromen, hersenbloedingen, multiple sclerose en schade aan het ruggemerg na bijvoorbeeld een operatie. Naast neuropathische pijn speelt het ruggemerg een belangrijke rol in neurotransmissie van motor signalen. Deze signalen worden verstoord bij een groot aantal aandoeningen waaronder ook neurodegeneratieve ziekten (zowel centraal als perifeer). Electromyografie (EMG) studies zijn van groot belang, omdat

ze ook in de kliniek worden toegepast en daarmee de vertaalslag van dit type experimenten vrij groot is. De toegepaste techniek voor metingen van elektrische signalen in het ruggemerg en de motorneuronen is gelijk aan die voor het meten van single-cell activiteit in de hersenen, alleen het gebied waar de electrodes worden ingebracht is niet in de hersenen gelegen. Metingen vinden plaats in de lumbaal regio van de ruggegraat of aan de nervus ischiadicus of een van de vertakkingen daarvan.

Electromyografische metingen worden geïnitieerd door een (elektrische) stimulus van de betrokken zenuwbaan, waarna signalen kunnen worden versterkt en gemeten. Belangrijke parameters als bij de single-cell metingen zijn: amplitude, frequentie (burst) karakter, lengte van individuele pulsen, interval tussen potentialen. Deze parameters kunnen door farmaca, ziekte of fysieke schade worden veranderd. In ons model is het mogelijk deze verandering te meten, maar ook of deze veranderingen door toediening van (nieuw) ontwikkelde geneesmiddelen verminderd kunnen worden of zelfs teniet gedaan kunnen worden. Door gebruik te maken van bekende receptor (ant)agonisten is het mogelijk om niet alleen de werkzaamheid, maar ook het werkingsmechanisme te bepalen. Ook is het mogelijk om parameters voor receptorbindings affiniteit te bepalen.

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

Dieren worden voor het experiment onder diepe, langdurige anesthesie gebracht (eventueel aangevuld met een analgeticum, wanneer deze pijler niet geborgd is door het anestheticum), afhankelijk van het pathway dat zal worden bestudeerd, wordt hiervoor inhalatie of een injectie anesthesie gebruikt. Diepe anesthesie wordt geconstateerd met afwezigheid van voet of cornea reflex. De rug van het dier of de achterpoot wordt geschoren en lokaal wordt analgesie toegepast. Op de plaats waar de electrode(s) moeten worden ingebracht, wordt de huid geopend.

Voor de ruggengraat worden de spieren van het doornuitsteeksel verwijderd en vervolgens wordt met een tang voorzichtig het doornuitsteeksel en de wervelboog verwijderd (laminectomie). Op deze wijze worden de zenuwbanen in het ruggemerg toegankelijk. Een stimulatie electrode en een meetelectrode worden vervolgens op verschillende locaties ingebracht. Door het geven van verschillende stimulie (somatosensorisch, chemisch of elektrisch) kunnen nu de reacties van individuele cellen in de dorsale hoorn van het ruggemerg gemeten worden. De verschillende cellen kunnen reageren op verschillende stimulie en worden zo geclassificeerd (lage drempel waarde, hoge drempelwaarde of wide dynamic range neuronen). Afhankelijk van de vraagstelling voor de verschillende te testen geneesmiddelen kan een cel van een van deze categoriën worden gekozen om verder te meten. Van deze cel wordt de vuurfrequentie/amplitude/burst patronen en individuele depolarisatie lengte gemeten, en gekeken welke invloed een te testen geneesmiddel hierop heeft. De test-stoffen zijn onder andere, maar uitsluitend: potentiële pijnstillers, inflammatie remmers of neuroprotectieve stoffen. Bijvoorbeeld kan er gekeken worden naar de vuurfrequentie van de wide dynamic range neuronen in reactie op een formaline injectie in de achterpoot als een model voor inflammatoire pijn. Er kan worden getest of nieuwe potentiële pijnstillers deze stimulaties remmen. Toedieningsroute van de test stof: lokaal, i.v., i.p., s.c. of oraal.

Voor de EMG metingen wordt het bovenbeen van het dier vrij geprepareerd, tot het mogelijk is om een stimulatie electrode aan te brengen op de nervus tibialis. en een intramusculaire recording electrode wordt ingebracht in de plantaris spieren voor de EMG (Ho and Waite, 2002; Schwarz et al., 1995; et al.). Zodra de electrodes geplaatst zijn kan na stimulatie worden gekeken naar de tijd tussen de Hoffmann reflex (via het ruggemerg) en de veel snellere directe M reflex (gemeten zeer kort op de stimulatie). Afhankelijk van chemische of fysieke beïnvloeding kan deze tijd langer of korter worden. Door toedienen van potentiële geneesmiddelen kan dit effect worden omgekeerd. Deze geneesmiddelen zouden bijvoorbeeld potentiële pijnstillers, inflammatie remmers of neuroprotectieve stoffen kunnen zijn. Naast het meten van de effectiviteit kan ook de farmacokinetiek worden bepaald: op welk moment na toediening is de dosis effectief. Dit kan worden versterkt door gelijktijdig een bloedmonster (via een onder anesthesie geplaatste catheter) te nemen waarin de concentratie van het geneesmiddel kan worden bepaald.

Alle dieren worden tijdens de anesthesie inductie en het experiment warm gehouden op een warmtematje. Temperatuur, ademhaling (sfrequentie) en zuurstofsaturatie van het bloed worden regelmatig gecontroleerd. Tevens worden de dieren op regelmatige basis subcutaan saline toegediend om dehydratie te voorkomen.

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

Op basis van een power-analyses is de berekende groeps-grootte 6 dieren. Met een een slagingspercentage van 70% (gabaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven; hierbij zijn technische problemen, het feit dat deze technieken pas recent zijn geïntroduceerd en complicaties tijdens de ingreep (waardoor verder meten niet mogelijk was bijvoorbeeld humaan eindpunt) de belangrijkste oorzaken zou de groepsgrootte 8 dieren moeten zijn voor elke te testen dosering van een stof. Wanneer deze experimenten meer routinematig worden verwacht wij dat het slagingspercentage zal stijgen tot 80-85% zoals bij andere experimenten.

Het minimaliseren van het aantal dieren is vooral mogelijk door de uitval tijdens de experimenten te minimaliseren. Een andere belangrijke keuze is het te testen aantal doseringen, door deze te minimaliseren kan het aantal experimenten worden beperkt. De experimenten duren steeds één volledige dag en kunnen in diezelfde dag worden geëvalueerd. Daarmee kan per dag worden bepaald of verdere dieren nodig zijn om een relevante meting te doen.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten wordt alleen gebruik gemaakt van ratten in verband met de grootte van de te testen structuren. Dieren zullen in alle gevallen van vergunde breeders worden betrokken, leeftijden van de dieren kunnen variëren afhankelijk van de vraagstelling voor het betreffende geneesmiddel.

In veel gevallen zal worden gewerkt met gezonde jong volwassen dieren. In specifieke gevallen zouden we echter ook gebruik willen maken van een passend (genetisch) pathologie model voor de ziekte waartegen het geneesmiddel is gericht. Deze dieren ontwikkelen de relevante ziekte verschijnselen pas op oudere leeftijd. In een dergelijk geval zou ook van dieren in een ander levensstadium gebruik gemaakt kunnen worden. Voorbeelden van toepasselijke modellen zijn hieronder gegeven. Wij benadrukken echter dat zoals in de project aanvraag is vermeld, de sponsor om specifieke redenen om een ander passend model kan vragen voor een neurologische aandoening. In een dergelijk geval zouden wij ook andere modellen willen kunnen testen op basis van de bestaande protocollen. Hierbij mag het potentiële intrinsieke ongerief van het model de aangevraagde ongerief classificatie niet overstijgen. Toetsing van het intrinsieke ongerief zal gebeuren door de IvD met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Ziekte van Parkinson: 6-OH-DA lesie model is een model dat wij goed beheersen. Daarnaast zijn er verschillende algemeen gebruikte genetische modellen zoals de alpha-synuclein overexpressie muis.

Ziekte van Alzheimer: hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar: men moet denken aan muizen die amyloid precursor proteïne of presenilin mutaties tot expressie brengen. Eventueel zou ook een model dat een mutante vorm van het Tau eiwit tot (over-)expressie bruikbaar kunnen zijn.

Ziekte van Huntington: ook hier zijn vooral genetische modellen beschikbaar. Momenteel hebben wij veel ervaring met het gebruik van de zogenaamde R6/2 muizen en de Q175 muizen. Beide muizen brengen het huntingtin eiwit tot expressie met glutamine repeats.

Naast modellen voor neurodegeneratie de volgende modellen mogelijk ook interessant om te testen met de hier beschreven protocollen.

Inflammatoire pijn: er zijn verschillende vormen van acute en chronische neurologische pijn. Voor deze studies is er echter maar één echt geschikt model en dat is voor acute inflammatoire pijn, geïnduceerd door toediening van een kleine hoeveelheid stof (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend formaline of capseïsin) of fysieke prikkeling van de voetzool (met bijvoorbeeld een van Freij element.

Het bestuderen van de H en M reflexen kan tevens een interessante toepassing zijn voor onderzoek naar geneesmiddelen tegen multiple sclerose of andere aandoeningen van motorneuronen. Voor multiple sclerose bestaat een klassiek model: experimental autoimmune encephalomyelitis. Dit model past ons inziens niet binnen de gestelde grenzen voor ongerief en zal dus niet worden toegepast. Wel zijn er op dit moment (induceerbare) genetische modellen beschikbaar voor dit type onderzoek.

Geschatte totaal aantallen: Uitgaande van 1 experiment voor spinal en 1 voor EMG per jaar voor 1 stof met 3 doseringen en een vehicle verwachten wij maximaal $2 \times 4 \times 8 \times 5 = 320$ dieren te gaan gebruiken over de periode van de aanvraag.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging van deze experimenten is niet mogelijk aangezien ze zijn gericht op het testen van geneesmiddelen in intacte levende organismen (wettelijke eis). Bij het testen van (nieuwe) farmaca is het van groot belang dat de normale fysiologie van het hele organisme wordt meegenomen, omdat de kinetiek van het molecuul in grote mate wordt bepaald door doorbloeding van de hersenen, het ruggemerg en andere organen, bovendien kan het zijn dat de stof in het lichaam een secundair effect levert (off-target effect), waardoor de in-vitro gemeten reactie niet plaatsvindt, wordt geremd of versterkt. Complexe structuren met veel interacties tussen cellen zoals deze in het ruggemerg voorkomen zijn vrijwel niet met celkweek te modelleren. Wij houden vorderingen in dit veld met veel interesse in de gaten om waar mogelijk in te toekomst wel met dergelijke modellen te kunnen gaan werken.

Van groot belang in dit geval zijn daarom verfijning en vermindering. Verfijning van deze experimenten is voornamelijk gericht op het lang stabiel onder anesthesie houden van de dieren, daarbij moet aandacht worden besteed aan lichaamstemperatuur, vochthuishouding en ademhaling (sfrequentie). Het uitvoeren van de experimenten moet met de grootst mogelijke nauwkeurigheid plaatsvinden. Om onze kennis en kunde op peil te houden werken wij voor de

laminectomie experimenten samen met één van de leidende academische instituten (Dr. R. Deumens) in het veld en hebben daar ook training ontvangen. Het voorbereiden van goede elektroden voor de experimenten en het regelmatig checken van de apparatuur is van groot belang om zeker te zijn dat de individuele experimenten op een goede manier plaatsvinden. Voor een aantal van de geplande experimenten zou het ook mogelijk kunnen zijn om gebruik te maken van ex-vivo preparaten van de zenuwbanden met het omliggende tissue. In dat geval kan het dier worden getermineerd na uitname van de zenuwbanden en voor aanvang van toediening van teststoffen. In zekere zin zou deze werkwijze ook tot vermindering kunnen leiden, omdat het aantal proeven per dier kan worden vergroot als bijvoorbeeld beide bovenbeenspieren met zenuwbanden worden gebruikt.

Net als bij de andere dierproefbeschrijvingen worden deze experimenten eerste in samenwerking met een sponsor besproken, waarbij wordt gekeken op welke wijze de vraagstelling het best wordt beantwoord. Het experimentele ontwerp wordt zo aangepast dat het te testen aantal doseringen minimaal is, de experimenten gerandomiseerd en waar mogelijk geblindeerd uitgevoerd worden en voldoende (maar niet te veel) dieren worden getest om de vraagstelling te beantwoorden.

Vermindering voor dit type experiment is mogelijk wanneer het uitval percentage kan worden gereduceerd, dat zal zeer waarschijnlijk gebeuren aangezien de methode meer routinematig zal worden toegepast bij Brains On-Line. Daarnaast biedt het dagelijks uitwerken van de data de mogelijkheid om te kijken of verdere experimenten nodig en zinvol zijn. Het gebruik van hetzelfde vehicle in verschillende experimenten biedt ook een mogelijkheid tot reductie.

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.

Door deze experimenten uitsluitend onder anesthesie uit te voeren met toepassing van algehele en lokale analgesie is de kans op pijn, lijden en angst tot een minimum gereduceerd. Tevens zijn de experimenten terminaal, waardoor ook negatieve gevolgen van het bijkomen uit de anesthesie worden vermeden. Milieueffecten worden geminimaliseerd door de juiste keuze van de te testen farmaca. Verwijdering van resterende chemicaliën en kadavers wordt uitgevoerd volgens geldende milieu wetgeving, waar nodig wordt door het afvalverwerkende bedrijf een certificaat afgegeven.

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.

Door goede literatuur kennis over bestaande mechanismen en experimenten is het goed mogelijk om te voorkomen dat experimenten nodeloos worden gedupliceerd. In een enkel geval zal het nodig zijn om experimenten te herhalen om een methode te valideren alvorens deze in te zetten voor het testen van nieuwe geneesmiddelen. Bijkomend voordeel van de literatuuronderzoeken is dat nieuwe methoden die verfijning of vermindering kunnen ondersteunen worden herkend. De te testen nieuwe geneesmiddelen zijn in de meeste gevallen niet eerder in electrofysiologische experimenten getest, onderzoekspartners komen juist naar ons toe omdat dergelijke expertise daar niet in-huis beschikbaar is. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat experimenten duplicaties zijn.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer

de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het onder anesthesie uitvoeren van de terminale experimenten is er buiten de stress veroorzaakt door het onder anesthesie brengen van de dieren geen verdere aantasting van het welzijn van de dieren te verwachten, anders dan door nog mogelijk onbekende bijwerkingen van de teststof.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Onvoldoende kennis van het nieuwe geneesmiddel.

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

Voordat een nieuwe stof wordt getest wordt bij de sponsor van een project navraag gedaan over in-vitro en in-vivo studies waarbij de stof in vergelijkbare concentraties is toegediend. Deze informatie is niet altijd beschikbaar, maar wanneer deze beschikbaar is wordt hij meegenomen in het opstellen van het protocol.

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.

Bijkomen uit anesthesie, niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen tijdens operatie of experiment.

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

Gering 1-5%, dit percentage zal afnemen naar mate de experimenten meer routinematig worden uitgevoerd.

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.

Terminaal, gering of matig. Gering ongerief wanneer gebruik wordt gemaakt van acute stimulie onder anesthesie die moeten dienen als model voor pijn. Matig ongerief wanneer gebruik zou worden gemaakt van een genetisch model voor neurodegeneratie (bijvoorbeeld maar niet uitsluitend een model voor multiple sclerose) waarbij de modificatie intrinsiek matig ongerief veroorzaakt. Als er sprake is van intrinsiek ongerief door toepassen van een pathologisch model wordt in overleg met de IvD een classificatie opgebouwd die het niet overstijgen van de verwachte classificatie borgt.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Hergebruik van deze dieren is niet mogelijk, aangezien ze zijn behandeld met een specifieke stof, interacties bij verdere teststoffen moeten worden uitgesloten. Bijkomen uit anesthesie na een laminectomie of het vrijprepareren van een spier levert additioneel ongerief, maar geen bijdrage aan beantwoording van de vraagstelling. Wel is het in het belang van de vraagstelling om vast te stellen of de electrodes op de juiste plaats was geïmplanteerd.

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

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 26 juni 2015 10:08
Aan: ZBO-CCD
Onderwerp: DEC advies nieuw project [REDACTED]
Bijlagen: 1_beschrijving_dierproeven_microsensor ontwikkeling_20150529.pdf; 2_beschrijving_dierproeven_microsensor_20150616.pdf; 3_beschrijving_dierproeven_microsensor innovatie_20150529.pdf; 4_beschrijving_dierproeven_single cell_20150616.pdf; 5_beschrijving_dierproeven_LTP_20150616.pdf; 6_beschrijving_dierproeven_spinal_HenM_20150616.pdf; DEC advies Brains On-line 8012 260615.docx; format_projectvoorstel_sensor_e-phys_20150609.pdf; NTS sensor e-phys_20150609.pdf

Categorieën: [REDACTED]

Beste medewerkers van het CCD bureau,

Hierbij stuur ik u een (versleuteld) DEC advies aangaande een ingestuurd project ([REDACTED]) van Brains On-line.

Tevens stuur ik u projectaanvraag, NTS en bijlages, tevens versleuteld volgens instructies. Het aanvraagformulier met natte handtekening is door Brains On-line per post verstuurd.

Vriendelijke groet, namens de DEC-RuG,

[REDACTED]

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

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

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RuG code **8012**)
2. Titel van het project: **Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding.**
3. Titel van de NTS: **Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:

-naam **DEC-RUG**
-telefoonnummer contactpersoon **[REDACTED]**
[REDACTED]
-mailadres contactpersoon **[REDACTED]**

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC **12-05-2015**
 - aanvraag compleet **12-05-2015**
 - in vergadering besproken **21-05-2015**
 - anderszins behandeld: **01-06-2015, 03-06-2015, 18-06-2015**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **26-30 Mei 2015, 4-17 Juni 2015**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **30-05-2015, 17-06-2015**
 - advies aan CCD **26-06-2015**

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

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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum **26-05-2015, 01-06-2015, 04-06-2015**
- Strekking van de vraag / vragen

Vraag omtrent te testen farmaca (welke groepen van farmaca), statistiek (verduidelijking gebruikte gegevens) en gebruik pathologie modellen (welke, ongerief)

- Datum antwoord **30-05-2015, 01-06-2015, 17-06-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en)

Farmaca: met name stoffen met een rol in het centraal zenuw stelsel, in een enkel geval stoffen met een target daarbuiten.

Welke stoffen exact: afhankelijk van de vraag van de klant.

Statistiek is aangevuld met gegevens. Pathologiemodellen verduidelijkt: over het algemeen modellen ziekte van Huntington, Alzheimer en Parkinson, passend binnen de ongerief classificatie van de aanvraag. Standard Operating Procedures (SOP's) zijn hiervoor beschikbaar.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet): **ja**
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een melding / een wijziging op een bestaande vergunning: **nieuwe aanvraag**
3. De DEC is competent/**bevoegd** om hierover te adviseren: **ja; de DEC-RuG treedt ook op voor de vergunninghouder Brains On-line**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken 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 doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **ja**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een essentieel / substantieel / reëel / beperkt belang: **substantieel belang/reëel belang. Dit oordeel is gebaseerd op het belang van het testen van potentieel nieuwe stoffen met de beschreven technieken. De DEC kent op dit moment niet de te testen stoffen en kan dus niet aangeven wat daarvan het belang is.**
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project: **Brains On-line is deskundig en zeer ervaren in het screenen van potentieel nieuwe geneesmiddelen met de in het protocol beschreven technieken en heeft daarvoor uitgebreide protocollen die kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen**

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
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd: **het grootste deel van de beschreven experimenten vindt onder volledige anesthesie plaats en is terminaal; bij een klein deel is er matig ongerief. Het ongerief is realistisch ingeschat**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen. Bij de ontwikkeling van nieuwe sensoren is er een voorfase in vitro. De eigenlijke experimenten moeten in dieren plaatsvinden.**
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 . **Het uiteindelijke aantal dieren zal afhangen van de aantallen te testen stoffen; per onderdeel/techniek is duidelijk aangegeven om hoeveel dieren het zal gaan. Er is een voldoende statistische onderbouwing van de aantallen.**
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. **Het grootste deel van de experimenten is terminaal met daarbij telkens optimale anesthesie en analgesie protocollen. Bij de experimenten waarbij in wakkere dieren wordt gemeten wordt zo veel als mogelijk gestreefd naar verfijning en is er een adequate welzijnsbewaking. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. Op sommige plaatsen in de protocollen wordt gesproken van pathologiemodellen. Na vragen is dit punt verduidelijkt: dit zijn over het algemeen modellen van ziekte van Huntington, Alzheimer en Parkinson, passend binnen de ongerief classificatie van de aanvraag. Standard operating procedures (SOP's) zijn hiervoor beschikbaar.**

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

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren, de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor mens, dier of milieu. De DEC kent niet de precieze aard van de te testen stoffen; het belang moet daarom afgeleid worden uit de algemene setting van het onderzoek en is naar het oordeel van de DEC in te schatten als reëel/substantieel. **De DEC vindt daarom dat het met het project beoogde belang van een goede screening van potentieel nieuwe medicijnen en de ontwikkeling van nieuwe biosensoren opwegen tegen het ongerief dat de dieren ondervinden. De DEC neemt hierbij mede in overweging dat de onderzoekers hebben aangetoond het streven naar de 3 V's in praktijk te brengen.**

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden.
De pathologie modellen mogen niet meer dan matig ongerief geven
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt
Dit besluit is unaniem door de DEC genomen

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 29 juni 2015 16:46
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Ontvangstbevestiging
Bijlagen: ontvangstbevestiging aanvraag AVD247002015156.pdf

Geachte heer/mevrouw,

Hierbij zenden wij u per mail een ontvangstbevestiging AVD/247002015156:"Electro (chemische) afleiding van biologische markers en farmacologisch beïnvloeding".

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

[REDACTED]

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains-On-Line B.V.

De Mudden 16
9747 AW GRONINGEN



Centrale Commissie Dierproeven

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD247002015156

Bijlagen

2

Datum 29-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 juni 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD247002015156. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. 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: 24700
Naam instelling of organisatie: Brains-On-Line B.V.
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 2094724
Straat en huisnummer: De Mudden 16
Postcode en plaats: 9747 AW GRONINGEN
IBAN: NL59INGB0681766174
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Brains-On-Line B.V.

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [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: 15 juni 2015
Geplande einddatum: 15 juni 2020
Titel project: Electro (chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding.
Titel niet-technische samenvatting: Testen van geneesmiddelen met behulp biologische en elektronisch sensoren
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: [REDACTED] Groningen
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: DEC-advies
 en nog 5 beschrijvingen

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Groningen
Datum: 26 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains-On-Line B.V.

De Mudden 16
9747 AW GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD247002015156

Bijlagen

2

Datum 29-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 29 juni 2015


Vervaldatum: 29 juli 2015


Factuurnummer: 201570156

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD247002015156	€ 741,00

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



Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 16 juli 2015 16:24
Aan: 
Onderwerp: Aanvullende informatie bij aanvraag AVD247002015156 (uw referentie 8012)

Geachte heer 

Op 26 juni heeft de DEC-RUG advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project 'Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding'.

In de bijlages beschrijving dierproeven is het gebruik van ratten en muizen beschreven. Er wordt niet vermeld of er sprake is van beide geslachten of een geslacht. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Daarom zou de CCD graag willen weten of dit besproken is in de DEC vergadering.

Indien u deze informatie niet bekend is, zullen we na u reactie met de aanvrager contact opnemen met dezelfde vraag.

In verband met doorlooptijd willen we u vragen om uiterlijk maandag, 20 juli 2015, op deze email te reageren.

Alvast hartelijk bedankt voor uw medewerking.

Met vriendelijke groet,



Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 21 juli 2015 21:42
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD247002015156

Excuus,

Ik zie nu bij herlezen dat indienen per netftp mogelijk is. Moet ik dan ook het "melding bijlagen" formulier mee sturen?

Dank,
[REDACTED]



[REDACTED]
Brains On-Line B.V.
P.O. Box 4030
9701 EA Groningen
The Netherlands

Tel.: +31 (0)50 317 1440
Fax: +31 (0)50 317 1449
info@brains-online.com

[REDACTED]
BIC
IBAN [REDACTED]

VAT N
Trade
www.k

CONFIDENTIALITY NOTICE: This e-mail message from Brains On-Line (including all attachments) is for the sole use of the intended recipient(s) and may contain confidential and privileged information. Any unauthorized review, use, disclosure, copying or distribution is strictly prohibited. If you are not the intended recipient, please contact the sender by reply e-mail and destroy all copies of the original message. E-mail is susceptible to data corruption, interception, unauthorized amendment, tampering and viruses, and we only send and receive e-mails on the basis that we are not liable for any such corruption, interception, amendment, tampering or viruses or any consequences thereof.

From: [REDACTED]
Sent: 21 July 2015 21:34
To: 'Info-zbo'
Subject: RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD247002015156

Beste [REDACTED]

Kan ik ook elektronisch reageren via het ftp systeem, of per mail?

Dank
[REDACTED]



[Redacted]

Brains On-Line B.V.
P.O. Box 4030
9701 EA Groningen
The Netherlands

Tel.: +31 (0)50 317 1440
Fax: +31 (0)50 317 1449
info@brains-online.com

[Redacted]
BIC [Redacted]
IBAN [Redacted]

VAT N
Trade
www.brains-online.com

CONFIDENTIALITY NOTICE: This e-mail message from Brains On-Line (including all attachments) is for the sole use of the intended recipient(s) and may contain confidential and privileged information. Any unauthorized review, use, disclosure, copying or distribution is strictly prohibited. If you are not the intended recipient, please contact the sender by reply e-mail and destroy all copies of the original message. E-mail is susceptible to data corruption, interception, unauthorized amendment, tampering and viruses, and we only send and receive e-mails on the basis that we are not liable for any such corruption, interception, amendment, tampering or viruses or any consequences thereof.

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: 21 July 2015 15:39
To: [Redacted]
Subject: Aanvullende informatie aanvraag AVD247002015156

Geachte [Redacted]

Op 29 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding." met aanvraagnummer AVD247002015156. 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.

De brief is ook per post naar de vergunninghouder, [Redacted] verzonden.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains On-line B.V.

De Mudden 16
9747AW Groningen



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centrale
commissiedierproeven.nl

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD247002015156

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 21 juli 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer [REDACTED]

Op 29 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding." met aanvraagnummer AVD247002015156. In uw aanvraag zitten voor mij 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:

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van ratten en muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Om u aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we graag uw antwoord uiterlijk dinsdag 28 juli 2015, indien mogelijk.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen

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).

Datum
21 juli 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD247002015156

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- 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

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Groningen, 23 juli 2015

Betreft: Reactie aanvulling aanvraag AVD247002015156

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Hierbij reageer ik op uw schrijven van 21 juli 2015 waarin u ons vraagt om nadere toelichting op onze aanvraag voor een projectvergunning dierproeven. Het gaat om het project "Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding." met aanvraagnummer AVD247002015156.

Vraagstelling:

"U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van ratten en muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren "in voorraad gedood" terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?"

Antwoord:

Het is voor de beschreven experimenten mogelijk om dieren van beide geslachten te gebruiken. In de praktijk zijn wij echter net als voor de soort-keuze en die van het type model afhankelijk van de vraagstelling van onze sponsor. In het verleden hebben wij in minder dan 5% van de studies gebruik gemaakt van vrouwelijke dieren op verzoek van de klant. Het streven zoals door u beschreven kunnen wij onderschrijven. Om deze reden, stellen wij voor ook richting onze sponsors deze vraag actief te gaan stellen bij aanvragen voor onderzoek. Waar het gaat om interne ontwikkelings projecten, zoals bijvoorbeeld deelproject A, zullen wij waar mogelijk vrouwelijke dieren inzetten.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd, mochten er nog aanvullende vragen zijn, dan zijn wij uiteraard bereid verdere toelichting te geven.

Met vriendelijke groeten,
Namens de vergunning houder,

[Redacted signature]



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains On-Line B.V.

De Mudden 16
9747AW Groningen



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD247002015156

Bijlagen
1

Datum 11 augustus 2015
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer [REDACTED]

Op 29 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding' met aanvraagnummer AVD247002015156. 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. U kunt met uw project 'Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding' starten. De vergunning wordt afgegeven van 11 augustus 2015 tot en met 15 juni 2020.

Procedure

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

Bezwaar

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

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

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

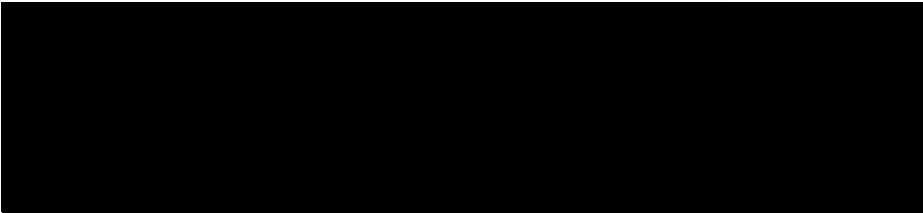
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

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

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 13 augustus 2015 10:12
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Beslissing aanvraag AVD247002015156
Bijlagen: Beschikking AVD247002015156 ondertekend.pdf; Vergunning AVD247002015156.pdf; AVD247002015156_DEC_advies_Brains_On_line_8012_260615.pdf

Geachte heer [REDACTED]

De commissie heeft uw aanvraag met nummer AVD247002015156 beoordeeld. Zie bijlagen.

De ondertekende beschikking is ook nog per post naar u toegezonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 13 augustus 2015 10:19
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling beslissing aanvraag AVD247002015156

Beste meneer [REDACTED]

Op 26 juni 2015 heeft de DEC RUG advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project "Electro(chemische) afleiding van biologische markers en farmacologische beïnvloeding.", uw kenmerk: 8012. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft nog een vraag aan de aanvrager gesteld:

"U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van ratten en muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?"

De aanvrager heeft antwoord gegeven.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen, onder de door u vastgestelde voorwaarde en onder andere door de CCD gestelde voorwaarden:

- 1) De pathologiemodellen mogen niet meer dan matig ongerief geven.
- 2) De Commissie vraagt de IvD met nadruk het gebruik van beide geslachten in overweging te nemen.
- 3) In Artikel 10, eerste lid, onder a, Wet op de dierproeven, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Inventaris Wob-verzoek W15-12									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015157								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x	x	
5	Mail DEC-advies 29-6-2015				x		x	x	
6	Verzoek DEC-advies			x					
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Mail ontvangstbevestiging 2-7-2015				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Factuur				x		x	x	
11	Mail aanvullende vragen I 17-7-2015				x		x	x	
12	Aanvulling verzoek 24-7-2015				x		x	x	
13	Mail aanvullende vragen II 17-8-2015				x		x	x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x	
16	Mail beschikking 31-8-2015				x		x	x	
17	Mail terugkoppeling DEC 16-9-2015				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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 <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	Rijksuniversiteit Groningen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	1179037
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	A. Desuinglaan 1, [REDACTED]
		Postbus	
		Postcode en plaats	9713AV Groningen
		IBAN	NL80ABNA0446049352
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
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	Onderzoeker / Docent
		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	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 9 - 2015 |
| Einddatum | 1 - 9 - 2016 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Evaluatie van het infectie verloop van een titanium implantaat met een PLGA coating die door inuline beschermt DNase I afgeeft
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1, [Redacted] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- 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	Hoogleraar RUG
Plaats	Groningen
Datum	06-07-2015
Handtekening	[REDACTED]





08 JULI 2015

CCD
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Nijenborgh 7
 9747 AG Groningen
 The Netherlands
 P.O. Box 11103
 9700 CC Groningen
 The Netherlands

Behandeld door

Datum
 6 juli 2015

Ons kenmerk

Uw kenmerk
 AVD105002015157

Onderwerp
 Einddatum aanvraag projectvergunning

Geachte heer, mevrouw,

Op 30 juni 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning naar u gestuurd. U heeft op 2 juli aan die aanvraag het nummer AVD105002015157 toegekend.

De geplande einddatum van het project is echter niet 31 december 2015 maar 1 september 2016. Bijgaand treft u nogmaals de projectaanvraag aan, met de juiste einddatum.

Met vriendelijke groet



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- 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.

Biomaterials are crucial for the restoration of bodily functions that have been impaired due to oncological surgery, trauma or wear. Implants are increasingly used due to the aging population, advances in healthcare and the increasing availability of medical treatment to the world's population. As the use of implants increases, biomaterial-associated infections remain the primary cause of implant failure. At the same time, the means to treat implant infections is decreasing by the rise of antibiotic resistant bacteria and the stagnated discovery of new antibiotic formulations. When bacteria colonize a biomaterial, they encapsulate themselves in a slimy layer of extracellular polymeric substances and because of this layer, combined with the dormant state biofilm bacteria remain in, the antibiotic susceptibility decreases drastically. Several in-vitro strategies are being studied that deal with coating of implant materials, either with the goal of killing bacteria adhering to the implant surface, or preventing bacteria to adhere to the material. In the latter case, bacteria remain planktonic and as such are more susceptible to both clearance by the immune system as well as antibiotic treatment, while at the same time the chance of developing resistance to antibiotics is decreased. Applying a DNase I coating has previously been effective in attacking the eDNA component of the extracellular polymeric substances of bacteria leading to decreased adhesion rates and biofilm formation.

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?

The main aim of this project is to evaluate whether coating of implant materials with DNase I decreases the occurrence and persistence of bacterial infections. Experience with subcutaneous infection models has been built up by [REDACTED] using the IVIS. [REDACTED] optimized the model to use bioluminescence imaging to measure infection persistence, allowing for prolonged assessment of animals over the course of the experiments without the need for termination at each time-point, thereby severely lowering the number of animals needed without compromising the scientific output.

3.3 Belang

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

Coating of titanium screws and implants with antibiotic containing poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is applied to prevent infection. Since antibiotic agents are losing their effectiveness against bacteria, that more increasingly show resistance against conventional antibiotic agents, an alternative is heavily needed. Infected knee and hip implants bring severe discomfort and can lead to the need for replacement surgery, which in turn bears an even higher infection risk. Coating implants with antibiotics carries the risk of releasing sub-inhibitory concentrations leading to resistant bacteria, whereas such resistance built up is not known to occur in the case of enzymes. [REDACTED]

The societal importance of any material or coating able to reduce the infection risk of knee- or hip implants can be considered highly significant, based on the prevalence of biomaterials associated infections and the consequences for those suffering from it. Even a small reduction in the percentage of complications due to bacterial infections will lead to a decrease in revision surgeries by numbers that will run into the thousands, accompanied with a large decrease in the associated discomfort and healthcare costs.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

To answer the research question, a pilot study is performed to determine the right bacterial inoculum concentration required to induce an adequate infection that can be resolved by the immune system in around three weeks. In this pilot study mice will be divided into two groups; 1 group without an implant, and 1 group receiving a titanium implant. In each group bacterial inoculates of different concentrations ([REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]) will be injected in 4 mice. Additionally, as a control, 4 mice in the implant group will not be injected with a bacterial inoculate, resulting in a total of 28 mice needed during this pilot study. During this pilot study the infection persistence will be monitored by IVIS and mice will be terminated after 4 weeks.

Once the proper inoculum concentration has been determined in the pilot study, the effect of DNase I coating on infection persistence will be evaluated by dividing the animals in 4 groups; [REDACTED]

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

Mice receiving an implant will be anesthetized and a small titanium implant will be placed in a subcutaneous pocket on flanks. After implantation and wound

closure, a bacterial inoculum, of a concentration determined in the pilot experiments, will be injected directly along the implant of half of the mice in groups 2, 3 and 4, whereas in group 1 the inoculate is injected in an empty pocket. These bacteria have been modified to express bioluminescence, which means they can be visualized by the IVIS. Mice will be anesthetized at different time points, subsequently imaged and allowed to recover from anesthesia (procedure takes around 10 – 15 minutes, imaging itself is around 5 minutes). At day 14, after the imaging session, half of the mice in each group will be sacrificed to allow for additional examination, by histology and CFU count. The other half of the mice will be followed for another 14 days (including imaging sessions) before being sacrificed for the same examination.

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.

Pilot experiments are required to determine the right amount of inoculum to be injected. Infections should be measurable by IVIS and persist throughout the experiment, without leading to lethal complications within the timeframe of the experiment. Once the appropriate inoculum has been established, the main experiment is initiated. The milestones of this experiment are set at days 14 and 28, the time points at which half of the animals will be sacrificed for additional examination.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Longitudinal murine study of infection persistence around titanium implant with DNase I containing coating by using in vivo bioluminescence imaging.
2	
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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
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	Longitudinal murine study of infection persistence around titanium implant with DNase I containing coating by using in vivo bioluminescence imaging.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Despite some differences, the immune systems of mice and human work in a similar manner and are affected by similar pathogens. As such, the murine model has become a generally accepted model for infection studies. Additionally, their small size makes them easy to handle and offers the possibility to use the IVIS for monitoring the infection.

The resulting parameters are mainly based on the results of using bioluminescent bacteria and the In-Vivo Imaging System (IVIS). In vivo imaging is used because this method allows longitudinal monitoring at several time points during the course of infection without the need of sacrificing animals at intermediate time points. Primary endpoints are infection severity and persistence based on bioluminescent flux recorded by IVIS at several time points during the course of the infection. Additionally, histological examination and colony-forming units (CFU) counts of the explanted biomaterial and ex-vivo

samples of tissue surrounding the implant will be performed at the end of the project.

IVIS monitoring of animals (mice) will be more frequent immediately after implantation when the infection starts to develop. At this point, mice will be scanned every two days. After the initial phase of the infection (after approx. 10 days) IVIS monitoring will be done less frequently, once every 4 days. Sacrificing the animals (mice) is necessary to perform histological examination and CFU counts, both important to verify IVIS results and to give additional information about the infection persistence and severity. The use of IVIS is meant to reduce the amount of animals used, however sacrificing a group of the animals after 14 days is considered necessary to evaluate the effect of the coating on the infection, in addition to IVIS. Histological information will give better insight to migration of bacteria into the surrounding tissue and as we aim to have an infection which can be cleared by the immune system in approximately 3 weeks (in the case of the absence of an implant) a time point half-way the experiment needs to be included to study the infection development properly. The 28 day time point is considered to be the period necessary for the infection to have been cleared (in the absence of an implant) and appropriate to evaluate the bacterial migration to the and tissue response in the case of a titanium implant.

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.

Prior to surgery, mice are anesthetized and titanium plates will be implanted subcutaneously in the flank of the mice. After recovery, a bacterial infection is induced by injection of bacterial inoculate. From this point on, mice will be periodically examined using IVIS while being anesthetized in order to avoid movements during the exposure time of the camera. After 14 days, half of the mice will be sacrificed by cervical dislocation under anesthesia. The remaining mice will be imaged until day 28, at which they will be sacrificed in the same way.

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

The use of IVIS for monitoring of infection persistence and severance allows us to examine mice without sacrificing them, offering maximal experimental output against a minimum amount of mice (only 2 time points of termination, including the end point, are necessary in this study). Furthermore, a pilot study is performed first to determine the right bacterial inoculum concentration required to induce an adequate infection that can be resolved by the immune system in around three weeks.

B. De dieren

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

Mouse: Balb/c OlaHsd

Gender: Female

Weight: around 20 g kept in IVC cages.

Estimated number of animals: 119

[Redacted]

Apart from the experimental groups, control groups without DNase I release are necessary, along with control groups without a coating, in order to discriminate the efficacy of the DNase I from the impact of the coating alone.

The use of IVIS is meant to reduce the amount of animals used, however, sacrificing half of the group (7 mice) after 14 days and the other half (6 mice) after 28 days is considered necessary to evaluate the effect of the coating on the infection by CFU count and histology, in addition to IVIS.

Overview of number of mice

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

Total #mice = 28 + 91 = 119

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?

x Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Replacement: The use of non-animal methods such as cell cultures or computer modeling is up to now insufficient for evaluating implant material coatings and their effects on preventing biomaterial-associated infections (BAI). The interplay of bacteria and the implant as a foreign body with the immune system is too complicated to mimic *in vitro* or *in silico*, within the presently available non-animal models.

Reduction: a pilot study is performed to determine the right bacterial inoculum concentration required to induce an adequate infection, therewith creating a better and secure base for the animal study. Further reduction of the number of animals is achieved by using the same mouse for multiple imaging sessions, which allows for each animal to serve as its own control. This means that animals do not have to be sacrificed at each one of the chosen time points, meaning that more results will be obtained using a minimal amount of animals.

Refinement: The implantation procedure is expected to cause mild discomfort. Pain medication is given peri-operatively to reduce the amount of discomfort. Infection will inevitably lead to discomfort, however, pilot experiments are meant to refine the inoculate concentration so that it gives a mild infection persisting for multiple days, without causing severe complications. Refinement of the imaging method is not possible, however, each session of imaging is done within one anesthesia period over a relatively short amount of time (<10 minutes for the entire procedure).

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.

To reduce the pain occurring after implantation, pain medication is given peri-operatively. Female mice are chosen to prevent fighting, which causes not only stress, but can also lead to re-opening of the implantation site. Animals will be anesthetized for imaging sessions and allowed to recover sufficiently, before another imaging session is started. Mice will be monitored for signs of apathy, weight loss and changes in eating and drinking patterns. Infections in mice will be monitored for excessive redness, pus and inflammation. The animals will be terminated when weight loss of more than 15%, apathy or inflammation (> 4 days) due to the infection is observed.

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.

There is no known literature of surface coating of DNase I to prevent bacterial adhesion and biofilm formation, other than published by our group. In that context, also no animal experiments have been performed employing DNase I as a coating, or in any other form, to prevent biomaterial-associated infections. In fact, no literature has been found using enzymes in general as a coating for the prevention or reduction of BAI in-vivo.

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.

Mice will be anesthetized for the implantation procedure and pain medication is given peri-operatively.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Besides pain, the main cause of discomfort is caused by stress from anesthesia.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Anesthesia induced for IVIS imaging sessions.

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

To minimize this discomfort, imaging sessions are kept as short as possible (< 10 min) and animals will be given at least 2 days to recover from the

individual imaging sessions once the initial infection stage has passed.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Mice will be monitored for signs of apathy, weight loss and changes in eating and drinking patterns. Infections in mice will be monitored for excessive redness, pus and inflammation. The animals will be terminated when weight loss of more than 15%, apathy or inflammation (> 4 days) due to the infection is observed. [REDACTED].

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

In previous subcutaneous infection models these criteria were reached only in very rare cases (< 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.

The cumulative amount of discomfort for the mice in the worst case is moderate. First of all, the implant procedure is expected to cause mild discomfort, while the imaging sessions will cause moderate discomfort, because these animals will be anesthetized repeatedly (single session would probably lead to mild discomfort, but the repetitive nature causes us to raise it to moderate). The other reason for the moderate level of discomfort is the induced bacterial infection in half of the group of mice. Even though we rate these effects as moderate, *in-vivo* imaging, which not requires termination of mice for each timepoint, keeps the amount of mice at a minimum, thereby justifying the discomfort experienced in this small group. Terminating the animals at each imaging timepoint might reduce the individual discomfort level, but would require much more mice to collect the same amount of data.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Histological examination and CFU counts are necessary to determine the end stage and severity of the induced infection, as well as to evaluate the response of, and migration of bacteria into, the surrounding tissues

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

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 29 juni 2015 9:57
Aan: ZBO-CCD
CC: Secretariaat DEC
Onderwerp: DEC advies nieuw project (interne RuG code 8009)
Bijlagen: bijlage_-_beschrijving_dierproeven 8009.pdf; DEC advies 8009.pdf; nts 8009.pdf; projectvoorstel 8009.pdf

Categorieën: [REDACTED]

Beste medewerkers van het CCD bureau,

Hierbij stuur ik u een (versleuteld) DEC advies aangaande een ingestuurd project (interne RuG code 8009). Tevens stuur ik u projectaanvraag, NTS en bijlage, tevens versleuteld volgens instructies. Het aanvraagformulier met natte handtekening is per post verstuurd.

Vriendelijke groet, namens de DEC-RuG,

[REDACTED]

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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

p/a

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002015157

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Op 29 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating met aanvraagnummer AVD105002015157.

DEC advies gevraagd

Uw aanvraag is naar DEC-RUG gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RuG code **8009**)
2. Titel van het project: **Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating**
3. Titel van de NTS: **Evaluatie van het infectieverloop van een titanium implantaat met een PLGA coating die door inuline beschermd DNase I afgeeft**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:

-naam	DEC-RUG
-telefoonnummer contactpersoon	██████████ / ██████████
-mailadres contactpersoon	██

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC **12-05-2015**
 - aanvraag compleet **12-05-2015**
 - in vergadering besproken **21-05-2015**
 - anderszins behandeld **15-06-2015, 17-06-2015, 24-06-2015**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **26-05-2015 tot 10-06-2015, 15-06-2015 tot 16-06-2015, 18-06-2015 tot 23-06-2015**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag **10-06-2015, 16-10-2015, 23-10-2015**

□ advies aan CCD **29-06-2015**

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

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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum **26-05-2015, 15-06-2015, 18-06-2015**
- Strekking van de vraag / vragen

Er zijn vragen gesteld omtrent uitvoering pilotexperiment, onderbouwing keuze en aantallen dieren inclusief statistische onderbouwing en juiste beschrijving van ongerief.

- Datum antwoord **10-06-2015, 16-06-2010, 23-06-2015.**
- Strekking van het (de) antwoord(en)

Pilotexperiment en verdere proefopzet is uitgelegd/ingevoegd in aanvraag, ongerief is beter aangegeven, statistiek voor groepsgroottes is gecorrigeerd

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

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

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **ja**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **substantieel / reëel** belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project: **ja**
5. De keuze voor de muis en de voorgestelde onderzoek handelingen zijn voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven door de toepassing van IVIS technologie voor het vaststellen van de mate van bacteriële infectie. 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.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren. Het onderzoek is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord. Het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Daarnaast is er het maatschappelijk belang. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor patiënten met implantaten (knie, heup) vanwege de beoogde vermindering van het risico van infectie. Aangezien ook in de uitvoering adequate aandacht is voor het belang van de proefdieren komt de DEC alle argumenten afwegend tot de conclusie dat het geplande onderzoek ethisch toelaatbaar is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt

Dit besluit is unaniem door de DEC genomen

Van: ZBO-CCD
Verzonden: donderdag 2 juli 2015 10:53
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Hierbij zenden wij u per mail een ontvangstbevestiging AVD/105002015157 met een aanvraag voor: "Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating".

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
[REDACTED]

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

p/a

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002015157

Bijlagen

2

Datum 02-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 29 juni 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002015157. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. 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: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1 [REDACTED]
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL80ABNA0446049352
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Onderzoeker / Docent
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

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 september 2015

Geplande einddatum: 31 december 2015

Titel project: Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating

Titel niet-technische samenvatting: Evaluatie van het infectie verloop van een titanium implantaat met een PLGA coating die door inuline beschermt DNase I afgeeft

Naam DEC: DEC-RUG

Postadres DEC: A. Deusinglaan 1 [REDACTED]

E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

Hoogleraar RUG, [REDACTED]

Plaats:

Groningen

Datum:

30 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen
p/a

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002015157

Bijlagen

2

Datum 02-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 juli 2015

Vervaldatum: 1 augustus 2015

Factuurnummer: 201570157

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002015157	€ 741,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

p/a

9713 AV GRONINGEN



Centrale Commissie

Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002015157

Bijlagen

2

Datum 02-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 juli 2015

Vervaldatum: 1 augustus 2015

Factuurnummer: 201570157

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002015157	€ 741,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

Postbus 72
9700 AB Groningen

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900 2800028
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD105002015157

Datum 29-06-2015
Onderwerp Eenmalig factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Bijlagen
factuur
1

Geachte heer/mevrouw,

Op 26 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating".

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. 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:
- Factuur

Van: ZBO-CCD
Verzonden: vrijdag 17 juli 2015 13:22
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: AVD105002015157 RE: DEC advies nieuw project (interne RuG code 8009)

Geachte heer

Graag had ik de aanvragende onderzoekster, [REDACTED], volgende vragen voorgelegd:

- 1) In de niet-technische samenvatting (kortweg: NTS) vermeldt u de namen van twee personen ([REDACTED] [REDACTED]) die klaarblijkelijk verbonden zijn/waren aan uw onderzoekseenheid. Volgens Artikel 4, 3. van de Dierproevenregeling 2014 moet de NTS anoniem zijn en mag geen namen van de gebruiker en zijn personeel bevatten. Kunt u mij een in die zin aangepaste NTS toezenden, bij voorkeur als Word-document?
- 2) Waarom gebruikt u in de poweranalyse de extreem hoge power van 95% en niet de algemeen in de biomedische wetenschappen gebruikte 80%?
- 3) In de beschrijving van de dierproef schrijft u onder B. dat u enkel dieren van het vrouwelijk geslacht gaat gebruiken. Kunt u (wetenschappelijk) aantonen dat de onderzoeksresultaten niet kunnen worden bereikt met dieren van beide geslachten in evenredige aantallen?

Misschien heeft uw DEC al een of meerdere van bovenstaande vragen aan [REDACTED] voorgelegd. Indien dit zo is, gelieve me dan de antwoorden op deze vragen toe te zenden, indien dit niet zo is, stel ik voor dat ik deze vragen maandag zelf naar haar mail.

Met dank voor uw medewerking.

Vriendelijke groet

[REDACTED]
Senior Adviseur

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

[REDACTED]
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

E: info@zbo-ccd.nl
T: 0900 28 000 28

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 29 juni 2015 9:57
Aan: ZBO-CCD
CC: Secretariaat DEC
Onderwerp: DEC advies nieuw project (interne RuG code 8009)

Beste medewerkers van het CCD bureau,

Hierbij stuur ik u een (versleuteld) DEC advies aangaande een ingestuurd project (interne RuG code 8009).

Tevens stuur ik u projectaanvraag, NTS en bijlage, tevens versleuteld volgens instructies. Het aanvraagformulier met natte handtekening is per post verstuurd.

Vriendelijke groet, namens de DEC-RuG,



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

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

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 17 augustus 2015 12:00
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: FW: AVD105002015157 RE: DEC advies nieuw project (interne RuG code 8009)
Bijlagen: format_nts-aangepast.doc; rebuttal CCD 24-7-2015.docx

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Dat is zeer vervelend. Er moet iets fout gegaan zijn, aangezien ik de antwoorden reeds op 24/7 heb gestuurd (zie onderstaande correspondentie).

Ik hoop dat u deze e-mail wel in goede orde ontvangt.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft uw projectaanvraag AVD 105002015157 getiteld: "Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin packaged DNase I releasing PLGA coating" in behandeling. Onderstaande vragen ter aanvulling van het dossier zijn u op 21 juli 2015 door mijn collega dhr. [REDACTED] voorgelegd.

Ik heb de behandeling van dit dossier van dhr. [REDACTED] overgenomen. Tot op heden hebben wij geen antwoord op deze vragen ontvangen. De CCD zou dit dossier graag in de eerstvolgende vergadering willen bespreken en daarom wil ik u vragen voor dinsdag 18 augustus deze vragen te beantwoorden. De leges zijn op 28 juli 2015 door ons ontvangen,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

- 1) In de niet-technische samenvatting (kortweg: NTS) vermeldt u de namen van twee personen ([REDACTED] en [REDACTED]) die klaarblijkelijk verbonden zijn/waren aan uw onderzoekseenheid. Volgens Artikel 4, 3. van de Dierproevenregeling 2014 moet de NTS anoniem zijn en mag geen namen van de gebruiker en zijn personeel bevatten. Kunt u mij een in die zin aangepaste NTS toezenden, bij voorkeur als Word-document?
- 2) Waarom gebruikt u in de poweranalyse de extreem hoge power van 95% en niet de algemeen in de biomedische wetenschappen gebruikte 80%?
- 3) In de beschrijving van de dierproef schrijft u onder B. dat u enkel dieren van het vrouwelijk geslacht gaat gebruiken. Kunt u (wetenschappelijk) aantonen dat de onderzoeksresultaten niet kunnen worden bereikt met dieren van beide geslachten in evenredige aantallen?

From: [REDACTED]
Sent: vrijdag 24 juli 2015 13:45
To: 'Info-zbo'
Subject: RE: AVD105002015157 RE: DEC advies nieuw project (interne RuG code 8009)

Geachte heer [REDACTED],

In de bijlage vindt u mijn rebuttal en aangepaste NTS. Ik hoop u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

[Redacted]

UMCG

[Redacted]

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Sent: dinsdag 21 juli 2015 11:59

To: [Redacted]

Cc: [Redacted]

Subject: FW: AVD105002015157 RE: DEC advies nieuw project (interne RuG code 8009)

Geachte mevrouw [Redacted]

Voor het behandelen van uw aanvraag hadden we graag uw antwoorden op onderstaande vragen ontvangen (zie verder).

Gelieve de ontbrekende informatie binnen veertien dagen op te sturen. Zonder deze informatie en de leges is de aanvraag niet compleet. De behandeling van uw aanvraag wordt vanaf vandaag opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. Zodra de aanvullingen en de leges zijn ontvangen, wordt uw aanvraag verder in behandeling genomen.

Met dank en vriendelijke groet

[Redacted]

[Redacted]

Senior Adviseur

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

[Redacted]

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

E: info@zbo-ccd.nl

T: 0900 28 000 28

Van: Secretariaat DEC [<mailto:secredec.umcg@umcg.nl>]

Verzonden: maandag 20 juli 2015 14:36

Aan: info@zbo-ccd.nl

Onderwerp: FW: AVD105002015157 RE: DEC advies nieuw project (interne RuG code 8009)

Geachte heer,

Eerder genoemde vragen zijn niet aan [Redacted] voorgelegd. Als u wilt kunt u de vragen zelf aan haar stellen.

met vriendelijke groet,

namens [Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

GRONINGEN

Tel: [REDACTED]
e-mail: secrdec.umcg@umcg.nl

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 20 juli 2015 13:48
Aan: Secretariaat DEC
Onderwerp: FW: AVD105002015157 RE: DEC advies nieuw project (interne RuG code 8009)

Van: ZBO-CCD [ZBO-CCD@minez.nl]
Verzonden: vrijdag 17 juli 2015 13:22
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: AVD105002015157 RE: DEC advies nieuw project (interne RuG code 8009)

Geachte heer

Graag had ik de aanvragende onderzoekster, [REDACTED], volgende vragen voorgelegd:

- 1) In de niet-technische samenvatting (kortweg: NTS) vermeldt u de namen van twee personen ([REDACTED] en [REDACTED]) die klaarblijkelijk verbonden zijn/waren aan uw onderzoekseenheid. Volgens Artikel 4, 3. van de Dierproevenregeling 2014 moet de NTS anoniem zijn en mag geen namen van de gebruiker en zijn personeel bevatten. Kunt u mij een in die zin aangepaste NTS toezenden, bij voorkeur als Word-document?
- 2) Waarom gebruikt u in de poweranalyse de extreem hoge power van 95% en niet de algemeen in de biomedische wetenschappen gebruikte 80%?
- 3) In de beschrijving van de dierproef schrijft u onder B. dat u enkel dieren van het vrouwelijk geslacht gaat gebruiken. Kunt u (wetenschappelijk) aantonen dat de onderzoeksresultaten niet kunnen worden bereikt met dieren van beide geslachten in evenredige aantallen?

Misschien heeft uw DEC al een of meerdere van bovenstaande vragen aan [REDACTED] voorgelegd. Indien dit zo is, gelieve me dan de antwoorden op deze vragen toe te zenden, indien dit niet zo is, stel ik voor dat ik deze vragen maandag zelf naar haar mail.

Met dank voor uw medewerking.

Vriendelijke groet

[REDACTED]
Senior Adviseur
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 29 juni 2015 9:57
Aan: ZBO-CCD
CC: Secretariaat DEC
Onderwerp: DEC advies nieuw project (interne RuG code 8009)

Beste medewerkers van het CCD bureau,

Hierbij stuur ik u een (versleuteld) DEC advies aangaande een ingestuurd project (interne RuG code 8009). Tevens stuur ik u projectaanvraag, NTS en bijlage, tevens versleuteld volgens instructies. Het aanvraagformulier met natte handtekening is per post verstuurd.

Vriendelijke groet, namens de DEC-RuG,

[REDACTED]

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

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

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

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

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

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

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

aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

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

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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV Groningen
Nederland

**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
AVD105002015157

Uw referentie

Datum 31 augustus 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
2

Geachte

Op 29 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating" met aanvraagnummer AVD105002015157. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 juli 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld in antwoord op vragen van de CCD.

Beslissing

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

U kunt met uw project "Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2015 tot 1 september 2016.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 29 juni 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet.

Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

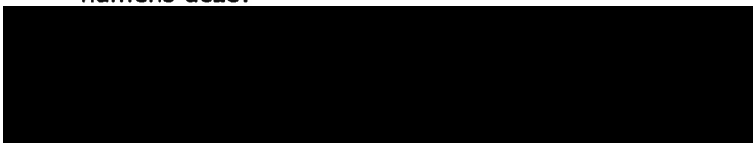
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

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,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen
Adres: A. Deusinglaan 1
Postcode en woonplaats: 9713 AV Groningen
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2015 tot 1 september 2016, voor het project "Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating" met aanvraagnummer AVD105002015157, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is onderzoeker/ docent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 8 juli 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 29 juni 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 29 juni 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 29 juni 2015;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 24 juli 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Longitudinal murine study of infection persistence around titanium implant with DNase I containing coating by using in vivo bioluminescence imaging	Muis, vrouwelijk	119	matig	geen

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Einde van een dierproef

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

Datum

31 augustus 2015

Onze referentieAanvraagnummer
AVD105002015157

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RuG code **8009**)
2. Titel van het project: **Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating**
3. Titel van de NTS: **Evaluatie van het infectieverloop van een titanium implantaat met een PLGA coating die door inuline beschermd DNase I afgeeft**
4. Type aanvraag:
 nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:

-naam

DEC-RUG

-telefoonnummer contactpersoon

██████████

██████████

-mailadres contactpersoon

██

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

- ontvangen door DEC **12-05-2015**
- aanvraag compleet **12-05-2015**
- in vergadering besproken **21-05-2015**
- anderszins behandeld **15-06-2015, 17-06-2015, 24-06-2015**
- termijnonderbreking(en) van / tot: **26-05-2015 tot 10-06-2015, 15-06-2105 tot 16-06-2015, 18-06-2015 tot 23-06-2015**
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
- aanpassing aanvraag **10-06-2015, 16-10-2015, 23-10-2015**

- advies aan CCD **29-06-2015**

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

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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum **26-05-2015, 15-06-2015, 18-06-2015**
- Strekking van de vraag / vragen

Er zijn vragen gesteld omtrent uitvoering pilotexperiment, onderbouwing keuze en aantallen dieren inclusief statistische onderbouwing en juiste beschrijving van ongerief.

- Datum antwoord **10-06-2015, 16-06-2010, 23-06-2015.**
- Strekking van het (de) antwoord(en)

Pilotexperiment en verdere proefopzet is uitgelegd/ingevoegd in aanvraag, ongerief is beter aangegeven, statistiek voor groepsgroottes is gecorrigeerd

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

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

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **ja**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **substantieel / reëel** belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project: **ja**
5. De keuze voor de muis en de voorgestelde onderzoek handelingen zijn voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven door de toepassing van IVIS technologie voor het vaststellen van de mate van bacteriële infectie. 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.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren. Het onderzoek is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord. Het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Daarnaast is er het maatschappelijk belang. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor patiënten met implantaten (knie, heup) vanwege de beoogde vermindering van het risico van infectie. Aangezien ook in de uitvoering adequate aandacht is voor het belang van de proefdieren komt de DEC alle argumenten afwegend tot de conclusie dat het geplande onderzoek ethisch toelaatbaar is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-
minderheidsstandpunt

Dit besluit is unaniem door de DEC genomen



Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 31 augustus 2015 16:23
Aan: [Redacted]
Onderwerp: AVD105002015157 beschikking
Bijlagen: beschikking AVD105002015157.pdf

Geachte [Redacted]

In de bijlage treft u de beschikking voor uw projectaanvraag AVD105002015157. In de bijlage ook het advies van DEC -RUG waarop dit besluit is gebaseerd. De brieven worden u ook per post toegestuurd.

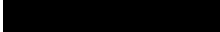
Met vriendelijke groet, [Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)



Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 16 september 2015 11:26
Aan: 
Onderwerp: terugkoppeling besluit CCD project AVD105002015157

Geachte leden van DEC –RUG,

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project AVD105002015157 getiteld; ‘Evaluation of the infection persistence of titanium implants coated with an inulin-packaged DNase I releasing PLGA coating’.

De CCD heeft besloten de vergunning conform uw advies te verlenen voor de aangevraagde periode van 1 jaar. Aan deze vergunning zijn geen voorwaarden verbonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
 E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)