

| <b>Inventaris Wob-verzoek W17-07</b> |                                      |                        |             |               |              |                          |               |               |             |   |
|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------|-------------|---|
|                                      |                                      | <b>wordt verstrekt</b> |             |               |              | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |             |   |
| <b>nr.</b>                           | <b>document NTS 2017843</b>          | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b> | <b>10.1.c</b>            | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |   |
| 1                                    | Aanvraagformulier                    |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 2                                    | NTS                                  | x                      |             |               |              |                          |               |               |             |   |
| 3                                    | Projectvoorstel                      |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |   |
| 4                                    | Bijlage animal procedure 1           |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 5                                    | Bijlage animal procedure 2           |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 6                                    | Bijlage animal procedure 3 origineel |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 7                                    | Bijlage animal procedure 3 aangepast |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 8                                    | Bijlage animal procedure 4           |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 9                                    | Bijlage animal procedure 5           |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 10                                   | Ontvangstbevestiging                 |                        |             |               |              |                          | x             |               |             |   |
| 11                                   | Mail verzoek om aanvulling           |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 12                                   | DEC advies                           |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 13                                   | Advies CCD                           |                        | x           |               |              |                          |               |               |             | x |
| 14                                   | Beschikking en vergunning            |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |



31 JAN. 2017

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

|     |   |  |  |
|-----|---|--|--|
| 1.1 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br><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 11800<br><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   | Academic Medical Center Amsterdam  |
|     |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde  | [REDACTED]   |
|     |   | KvK-nummer   | 343362777  |
|     |   | Straat en huisnummer   | Meibergdreef 31  |
|     |   | Postbus  |  |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Postcode en plaats   | 1105AZ Amsterdam   |
|     |   | IBAN   | NL68RABO0136166741   |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer  | Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC                                      |
| 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  | Principal Investigator/Onderzoeker   |
|     |   | 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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  | Onderzoeker  |
|     |   | Afdeling   | [REDACTED]   |
|     |   | Telefoonnummer   | [REDACTED]   |
|     |   | E-mailadres  | [REDACTED]   |

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |             |   |
|-----------------------------|-------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED]  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 - 3 - 2017   |
| Einddatum  | 28 - 02 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerose
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerose
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                 |
|-------------|-----------------|
| Naam DEC    | DEC AMC         |
| Postadres   | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres | [REDACTED]      |

## 4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1727 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*


## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening


- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Amsterdam

Datum 27 - 1 - 2017

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 11800 |
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Academisch Medisch Centrum - Amsterdam |
- 1.3 Vul de titel van het project in. | De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerose |

### 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.

B-lymfocyten hebben verschillende functies binnen het immuunsysteem. Zij produceren onder andere antilichamen, presenteren antigenen aan T-lymfocyten en moduleren immuunreacties door de productie van cytokines<sup>1</sup>. B-lymfocyten kunnen echter ook bijdragen aan de ontwikkeling van verschillende auto-immuunziekten, zoals reumatoïde artritis (RA) en multiple sclerose (MS) door onder andere antilichamen te produceren tegen lichaamseigen eiwitten. RA wordt gekenmerkt door chronische ontstekingen van de perifere gewrichten en komt bij ongeveer 1-3% van de bevolking voor. MS is een zeer ernstige auto-immuunziekte van het centrale zenuwstelsel met een prevalentie die varieert tussen de 2 en 150 patiënten per 100.000 personen. Van beide aandoeningen is de oorzaak nog niet bekend.

Wel is aangetoond dat B-lymfocyten een belangrijke rol in de ontwikkeling van RA spelen, aangezien therapie door middel van rituximab (anti-CD20 antilichamen die B-lymfocyten verwijderen) effectief is in patiënten<sup>2</sup>. Het is echter niet bekend of alle B-lymfocyt-subsets schadelijk zijn en welke moleculaire signaal-systemen betrokken zijn bij de regulatie van verschillende B-cel-subsets. Recentelijk is bijvoorbeeld een immuun-remmende, IL-10 producerende regulatoire B-cel-subset geïdentificeerd die een rol speelt in verschillende muismodellen van auto-immuniteit en artritis<sup>3-5</sup>. In patiënten zijn hoge aantallen IL-10 producerende B-cellen geassocieerd met een lagere ziektescore en ontstekingswaarden in het bloed<sup>6</sup>.

Meer kennis is nodig over de specifieke pathogene en regulatoire (immuun-remmende) B-cel-subsets en hun rol in auto-immuunziekten en welke moleculaire signaal-systemen hierbij betrokken zijn.

#### Muis modellen

Voor onze experimenten willen we gebruik maken van een aantal ziektemodellen in de muis, namelijk: collageen-geïnduceerde artritis (CIA) en collageen-antilichaam geïnduceerde artritis (CAIA) als muismodellen voor artritis; en experimentele auto-immuun encefalomyelitis (EAE) als muismodel voor MS.

In het CIA-model worden muizen geïmmuniseerd met collageen, wat uiteindelijk resulteert in gewrichtsontsteking door de productie van anti-collageen antilichamen door B-lymfocyten. Met dit model kunnen we de initiatie van artritis goed nabootsen en hiervoor is de antilichaam-productie van B-lymfocyten cruciaal.

In het CAIA-model worden muizen geïnjecteerd met anti-collageen auto-antilichamen. Dit model is daarmee onafhankelijk van de antilichaam-productie van de B-lymfocyten, en om die reden geschikt om andere functies van B-lymfocyten, zoals antigeen-presentatie en cytokine-productie, in kaart te brengen tijdens de chronische fase van artritis.

In het EAE-model worden muizen geïmmuniseerd met MOG-eiwit of peptide om respectievelijk B- en T-, of enkel T-cellen te activeren. Uiteindelijk leidt dit tot neuroinflammatie en progressieve verlamingsverschijnselen zoals in MS. Dit ziektemodel is geschikt om de functie van zowel T- als B-lymfocyten te onderzoeken en dient als tweede, onafhankelijk model voor auto-immuniteit. In het EAE-model zijn vooral de T-lymfocyten de cellen die de ziekteverschijnselen opwekken, de B-cellen spelen een rol door het presenteren van het MOG-eiwit aan de T-lymfocyten en deze cellen te ondersteunen in het activatie-proces<sup>7</sup>.

#### Bob1 en auto-immuniteit

Gen-expressie-analyse van samples afkomstig van RA-patiënten en controle-patiënten heeft aangetoond dat de transcriptiefactor Bob1, de B-cel-groefactor APRIL en 1 van zijn receptoren BCMA sterk geassocieerd zijn met RA. In eerdere experimenten is aangetoond dat Bob1-deficiënte muizen compleet beschermd zijn tegen CIA en dat deze bescherming veroorzaakt wordt door de afwezigheid van Bob1 specifiek in B-lymfocyten.

**Beide bevindingen hebben geleid tot onze hypothese waarin we stellen dat Bob1 een belangrijke transcriptiefactor is voor de regulatie van pathogene B-cel-responsen in auto-immuniteit.**

#### APRIL en auto-immuniteit

Muizen die de B-cel-groefactor APRIL tot overexpressie brengen zijn deels beschermd tegen CIA en EAE.

Onderzoek in ons laboratorium heeft aangetoond dat APRIL zorgt voor de inductie van IL-10 producerende B cellen. Reductie van deze IL-10-producerende B cellen door middel van peritoneale shock leidt tot een verergering van de CIA, wat tot **de hypothese heeft geleid dat APRIL betrokken is bij de expansie en/of activatie van regulatoire B cellen die immuun responsen kunnen remmen.**

#### Fc receptoren en auto-immuniteit

In de meerderheid van de RA patiënten maken B lymfocyten auto-antilichamen (antilichamen gericht tegen lichaamseigen structuren). We hebben eerder laten zien dat deze auto-antilichamen door binding aan Fc receptoren op bepaalde immuun cellen (macrofagen) een sterke ontstekingsreactie veroorzaken, gekenmerkt door productie van ontstekingsmediatoren zoals TNF<sup>8</sup>. Een vergelijkbaar effect zien we bij MS patiënten, waar de meerderheid van de patiënten auto-antilichamen heeft tegen myelinede structuren in de hersenen. Onze preliminaire data met gebruik van humaan post-mortem weefsel laat inderdaad zien dat macrofagen in de hersenen (de zogenoemde microglia) ook geactiveerd worden door antilichamen. **Deze bevindingen hebben geleid tot onze hypothese dat auto-antilichamen, door het activeren van Fc receptoren, sterke ontstekingsreacties veroorzaken in auto-immuunziekten als RA en MS.**

Samengevat zijn B lymfocyten belangrijk voor de ontwikkeling van auto-immuunziekten, zoals RA en MS. Of alle soorten B lymfocyten echter schadelijk zijn, is nog niet bekend. Ook is nog niet bekend hoe de functie en activiteit van verschillende soorten B lymfocyten wordt gereguleerd in patiënten met auto-immuunziekten. In dit project willen we de moleculaire signaal systemen identificeren die zorgen voor de regulatie van B lymfocyt responsen in RA en MS, met daarbij de focus op signalering door drie signaalroutes betrokken bij immuun-activering door B lymfocyten:

1. Bob1 signalering in B en T lymfocyten en de effecten van verhoogde of afwezige Bob1 expressie op de ontwikkeling van CIA/CAIA en EAE.
2. APRIL geïnduceerde regulatoire B lymfocyten en de capaciteit van deze soort B lymfocyten om te beschermen tegen auto-immuniteit. Dit wordt bestudeerd in CIA/CAIA en EAE.
3. Fc receptor signalering in myeloïde cellen zoals macrofagen en het effect hiervan op de ontwikkeling van CIA/CAIA en EAE.

Onderzoek naar deze drie signaalroutes geeft inzicht in de mechanismen die pathogene B cellen aansturen (via Bob1), de manieren waarop regulatoire B cellen ziekte kunnen inperken (via APRIL gemedieerde IL10 productie) en de effecten die B cellen kunnen bewerkstelligen via hun antilichaam productie en de binding van deze antilichamen aan Fc receptoren.

Kennis over de regulatie van B lymfocyten door Bob1, APRIL en Fc receptoren in auto-immuniteit kan leiden tot de ontwikkeling van gerichte therapieën (bijvoorbeeld door APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten te stimuleren en pathogene B lymfocyt subsets te remmen) wat mogelijk bij zal dragen aan een verbetering van het ziektebeeld in RA en MS.

#### **Referenties:**

1. Shen, P. and S. Fillatreau, *Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(7): p. 441-51.
2. Edwards, J.C., L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D.R. Close, R.M. Stevens, and T. Shaw, *Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2004. **350**(25): p. 2572-81.
3. Fillatreau, S., C.H. Sweeney, M.J. McGeachy, D. Gray, and S.M. Anderton, *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 944-50.
4. Yanaba, K., J.D. Bouaziz, K.M. Haas, J.C. Poe, M. Fujimoto, and T.F. Tedder, *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 639-50.
5. Yang, M., J. Deng, Y. Liu, K.H. Ko, X. Wang, Z. Jiao, S. Wang, Z. Hua, L. Sun, G. Srivastava, C.S. Lau, X. Cao, and L. Lu, *IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation*. Am J Pathol, 2012. **180**(6): p. 2375-85.
6. Daien, C.I., S. Gailhac, T. Mura, R. Audo, B. Combe, M. Hahne, and J. Morel, *Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease*

- activity*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(8): p. 2037-46.
7. Bettelli, E., Beaten, D., Jager, A., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K., *Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice*. J.Clin. Invest. 2006. **116**(9):2393-402.
  8. Vogelpoel, L.T., I.S. Hansen, T. Rispens, F.J. Muller, T.M. van Capel, M.C. Turina, J.B. Vos, D.L. Baeten, M.L. Kapsenberg, E.C. de Jong and J. den Dunnen, *Fc gamma receptor-TLR cross-talk elicits pro-inflammatory cytokine production by human M2 macrophages*. Nat. Commun. 2014. **5**(5444).

### 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?

B lymfocyten zijn belangrijk voor de ontwikkeling van auto-immuunziekten, RA en MS. Of alle soorten B lymfocyten echter schadelijk zijn, is nog niet bekend. Ook is nog niet bekend hoe de functie en activiteit van verschillende soorten B lymfocyten wordt gereguleerd in patiënten met auto-immuunziekten. Gebaseerd op onze huidige resultaten (beschreven in paragraaf 3.1) is onze doelstelling het bestuderen van B lymfocyten en (auto-)antilichamen en hun rol in auto-immuunziekten, zoals RA en MS. Onze focus ligt vooral op het bestuderen van de functionele aspecten van de B lymfocyten, zoals antigeen-presentatie, cytokine- en (auto-)antilichaam productie en de regulatie van deze cellen.

Deze doelstelling zal worden uitgewerkt in 3 subdoelen:

1. De rol van Bob1 in de ontwikkeling van auto-immuniteit, en specifiek de effecten van verhoogde Bob1 expressie op B en T lymfocyt differentiatie en functies.
2. Aantonen dat IL-10, specifiek geproduceerd door de APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten, een ontstekingsremmende werking heeft en dat een transfer van deze cellen bescherming biedt tegen auto-immuniteit. Ook willen we de onderliggende mechanismen identificeren, die een rol spelen in de regulatoire B lymfocyten geïnduceerd door APRIL.
3. De immuun activering van macrofagen en microglia door auto-antilichamen en de gevolgen hiervan op ontsteking en auto-immuniteit.

Haalbaarheid:

B lymfocyten kunnen schadelijk zijn in auto-immuniteit, maar kunnen mogelijk ook een beschermende, immuun regulerende functie hebben. In onze onderzoeksgroep zijn we geïnteresseerd in het definiëren van verschillende B lymfocyt subsets en hun effector functies. De in deze aanvraag beschreven methoden en diermodellen worden al jaren gebruikt binnen onze groep en onderzoeksinstituut, wat experimentele haalbaarheid garandeert. Tevens beschikt de proefdierfaciliteit van het AMC over de benodigde infrastructuur om de experimenten correct uit te voeren. Gezien onze eerder behaalde resultaten (beschreven in paragraaf 3.1) en onze expertise op dit vakgebied, achten wij de kans groot dat onze doelstellingen behaald worden.

### 3.3 Belang

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

#### **Wetenschappelijke belang**

B lymfocyten spelen een belangrijke rol in het ontstaan en het in stand houden van auto-immuunziekten. Er is nog onvoldoende bekend over de moleculaire en cellulaire regulatie van B lymfocyten en hun specifieke bijdrage aan auto-immuunziekten. Meer kennis over de verschillende functionele aspecten van B lymfocyten in het ziekteproces en kennis over de moleculaire regulatie van deze cellen is daarom nodig. Mogelijk kan deze kennis bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe strategieën om auto-



immuunziekten in patiënten te behandelen.

### **Maatschappelijke belang**

RA is een ernstige ziekte die van grote invloed is op het dagelijks leven van patiënten en de maatschappij. Hoewel de symptomen goed te behandelen zijn in 50-70% van de patiënten, met veelal dure medicatie, is niet iedereen geholpen met de huidige therapieën. Bovendien is geen van de therapieën in staat om langdurige remissie te bereiken of zelfs te genezen.

MS is een ziekte die vooral jongvolwassenen aandoet, met een zeer ernstig ziektebeeld. Ondanks dat er vooruitgang is op het gebied van behandeling, is het nog niet mogelijk om de exacerbaties waardoor de ziekte gekenmerkt wordt te voorkomen. Ook MS is nog steeds niet te genezen. Daarom is het voor beide ziektes nog steeds belangrijk om te zoeken naar nieuwe vormen van therapeutische interventie. Ons onderzoek richt zich op het in kaart brengen van de rol en moleculaire regulatie van verschillende soorten B lymfocyten in auto-immuniteit, met een focus op de rol van de eiwitten Bob-1 en APRIL en de gevolgen van Fc receptor signalering op ontstekingen en pathogenese. Op dit moment is het onvoldoende bekend hoe deze eiwitten en Fc receptor signalering bijdragen aan de pathogenese van RA en MS, wel is uit eerder onderzoek binnen onze onderzoeksgroep op humaan materiaal en weefsel als ook met dierexperimenteel onderzoek gebleken dat deze factoren veranderd meetbaar zijn in RA. Zodra we meer kennis hebben over de functie en regulatie van verschillende soorten B lymfocyten in auto-immuniteit via Bob-1, APRIL en Fc receptor signalering, zullen wij deze factoren remmen/stimuleren in de muizen als therapie voor RA en/of MS. De uitkomsten uit deze experimenten zullen aantonen of het remmen/stimuleren van Bob-1, APRIL of Fc receptor signalering in RA en MS modellen een mogelijke nieuwe therapie voor RA en/of MS patiënten kan worden. Onze afdeling en onderzoeksgroep heeft een zeer translationeel karakter, waardoor het mogelijk is om interessante, relevante resultaten uit de beschreven dierexperimenten ook te onderzoeken in patiënten via kleine proof-of-concept klinische trials.

Wij achten het wetenschappelijk en maatschappelijk belang groot genoeg om dierexperimenteel onderzoek te rechtvaardigen.

---

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

De studies worden als volgt opgezet:

#### **Subdoel 1/ De rol van Bob1 in de ontwikkeling van auto-immuniteit, en specifiek de effecten van Bob1 overexpressie/blokkade op B lymfocyt differentiatie en antigeen-presentatie.**

Wij hebben een muis ontwikkeld die het mogelijk maakt om Bob1 overexpressie aan te zetten door middel van een Cre-Lox systeem. Tevens beschikken wij over een Bob1 knock out muis. Wij zullen Bob1 tot overexpressie brengen in onder andere B lymfocyten, maar ook in T lymfocyten die via hun rol als T folliculaire helper lymfocyten de B lymfocyt functie kunnen beïnvloeden. De muizen zullen, in eerste instantie, een half jaar gevolgd worden om te bepalen of zij spontaan (auto-immuun)ziekte(n) ontwikkelen. Symptomen van ziekte(n) zullen tijdens die periode in kaart gebracht worden.

Indien deze muizen niet binnen 3 maanden immuun deficiënties vertonen (tekenen van auto-immuniteit, zoals gewichtsafname, diarree, zwelling van de poten etc), zullen we arthritis, dan wel een EAE induceren om te kijken of Bob1 overexpressie deze specifieke ziekten verergert ten opzichte van de ziekte in controle dieren (zonder Bob1 overexpressie). Zo kunnen wij met behulp van het CIA model de rol van Bob1 overexpressie in pathogene B cellen in het ziektebeeld van RA in kaart brengen. Het CIA model is geschikt om de effecten van Bob1 overexpressie op antilichaam productie in kaart te brengen. Deze antilichamen zijn cruciaal voor het induceren van CIA. Het CAIA model zal gebruikt worden om de effecten van Bob1 overexpressie op andere functies van B lymfocyten, zoals cytokine productie en antigeen presentatie, te onderzoeken. Het EAE model zal gebruikt worden om de effecten van Bob1 overexpressie op B en T lymfocyt activatie te onderzoeken.

De Bob1 overexpressie muizen worden vergeleken met wild type muizen en muizen met een Bob1

---

deficiëntie in ernst van de ziekte en de snelheid waarmee het ziektebeeld zich ontwikkeld. Daarnaast zullen wij *ex vivo* experimenten uitvoeren om verschillen in de functionaliteit van B lymfocyten te bestuderen bij overexpressie, dan wel deficiëntie van Bob1.

Om te bepalen of Bob1 overexpressie belangrijk is in de inductie van ziekte, of pas later in het ziekteverloop, maken we gebruik van het Cre-Lox systeem. Dit systeem maakt het mogelijk om de expressie van genen op een specifiek moment te reguleren. In ons geval brengen we Bob1 tot overexpressie voor of na ziekte inductie.

### **Subdoel 2/ De rol van APRIL-gemedieerde regulatoire B lymfocyten in auto-immuniteit en de identificatie van het onderliggende mechanisme in deze specifieke B lymfocyten.**

Als eerste zullen we onderzoeken of APRIL-overexpressie leidt tot het ontstaan van B lymfocyten met een regulatoir fenotype die beschermen tegen auto-immuniteit. De mogelijk beschermende functie van APRIL-geïnduceerde B lymfocyten zal getest worden in het CIA en CAIA model. Voor dit onderzoek worden wild type muizen en muizen die APRIL tot overexpressie brengen gebruikt. Daarnaast zullen we *ex vivo* de cytokine productie en receptor expressie bestuderen van APRIL-gemedieerde regulatoire B lymfocyten in vergelijking met andere subtypen B lymfocyten. Indien deze regulatoire B lymfocyten inderdaad een beschermende functie lijken te hebben in artritis, zullen we bestuderen of deze immuun-regulerende B lymfocyten actief ziekte kunnen remmen. Hiervoor zullen we muizen met artritis behandelen met deze regulerende B lymfocyten als cellulaire therapie.

In het EAE model zijn de T lymfocyten de cellen die hoofdzakelijk de ziekte veroorzaken. In dit model zal bestudeerd worden of de APRIL-gemedieerde, regulatoire B lymfocyten deze T cellen kunnen remmen in hun functie of bescherming kunnen bieden tegen deze pathogene T cellen, waardoor de ernst van de ziekte verminderd of zelfs voorkomen wordt. -Indien dit het geval blijkt te zijn, zullen we bestuderen of de immuun-regulerende B lymfocyten actief ziekte kunnen remmen. Hiervoor zullen we muizen met EAE behandelen met deze regulerende B lymfocyten als cellulaire therapie.

### **Subdoel 3/ De immuun activering van macrofagen en microglia door auto-antilichamen.**

Uit *in vitro* proeven op humane cellen is duidelijk geworden dat auto-antilichamen d.m.v. signalering via Fc receptoren voor sterke immuun activering zorgen van macrofagen en microglia, twee celtypen die een belangrijke rol spelen bij respectievelijk RA en MS. Ons vervolgonderzoek richt zich op dit moment op het identificeren van de onderliggende moleculaire mechanismen van de ontstekingsreacties door activering van Fc receptoren. Het identificeren van de onderliggende signaleringsmoleculen geeft ons de mogelijkheid om deze specifiek te remmen d.m.v. zogenaamde small molecule inhibitors, die steeds vaker gebruikt worden als therapeutische behandeling van zowel RA als inflammatoire darmziekten (IBD) (bv tofacitinib en baricitinib – beide JAK remmers). De vraag of immuun activatie van macrofagen en microglia d.m.v signalering via Fc receptoren een rol speelt tijdens de pathogenese van auto-immuunziekten zal beantwoord worden met de hier beschreven diermodellen voor RA en MS. Het CIA model wordt gebruikt om de rol van de antilichamen die geproduceerd worden door B lymfocyten op de activatie van macrofagen te onderzoeken. Ook wordt onderzocht in welke mate deze macrofaag activatie belangrijk is voor de ernst van de ziekte. In het CAIA model worden antilichamen ingespoten, in dit model is de antilichaam producerende rol van B lymfocyten niet nodig voor ziekte inductie. Dit model maakt het mogelijk om het directe effect van antilichamen op macrofaag activatie en de ontwikkeling van de ziekte te onderzoeken, zonder activatie van de B lymfocyten. Het EAE model wordt gebruikt, omdat uit eerder onderzoek is gebleken dat ook microglia (aanwezig in de hersenen) geactiveerd raken door Fc receptor signalering via (auto-)antilichamen. In hoeverre dit bijdraagt aan het ontstaan of de ernst van de ziekte wordt getest in het EAE model. Ook zullen we onderzoeken of JAK inhibitie de activatie van Fc receptoren in auto-immuunziekten daadwerkelijk kan blokkeren en of dit leidt tot verminderde ziekte in de artritis en MS modellen.

gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Voor de verschillende deelprojecten zullen de volgende dierproeven worden gebruikt:

**Subdoel 1/ De rol van Bob1 in de ontwikkeling van auto-immuniteit, en specifiek de effecten van Bob1 overexpressie/blokkade op B lymfocyt differentiatie en antigeen presentatie.**

De effecten van Bob1 overexpressie op B en T lymfocyt ontwikkeling en functies zal allereerst worden onderzocht in *ex vivo* experimenten.

Omdat de effecten van Bob1 overexpressie op B lymfocyt ontwikkeling *in vivo* nog niet bekend zijn en het ook niet bekend is of deze overexpressie kan leiden tot spontane (auto-immun)ziekte, zal tegelijkertijd het mogelijke ontstaan van spontane systemische auto-immuniteit in kaart worden gebracht gedurende 6 maanden. Mochten de Bob1 overexpressie muizen niet binnen de eerste drie maanden spontaan ziekteverschijnselen vertonen, dan wordt er gestart met CIA en EAE experimenten om auto-immuniteit te induceren en de effecten van Bob1 overexpressie hierop te bepalen. Het CAIA model zal worden gebruikt om de rol van Bob1 te onderzoeken in een model waar antilichaamproductie door B lymfocyten niet belangrijk is voor ziekte inductie.

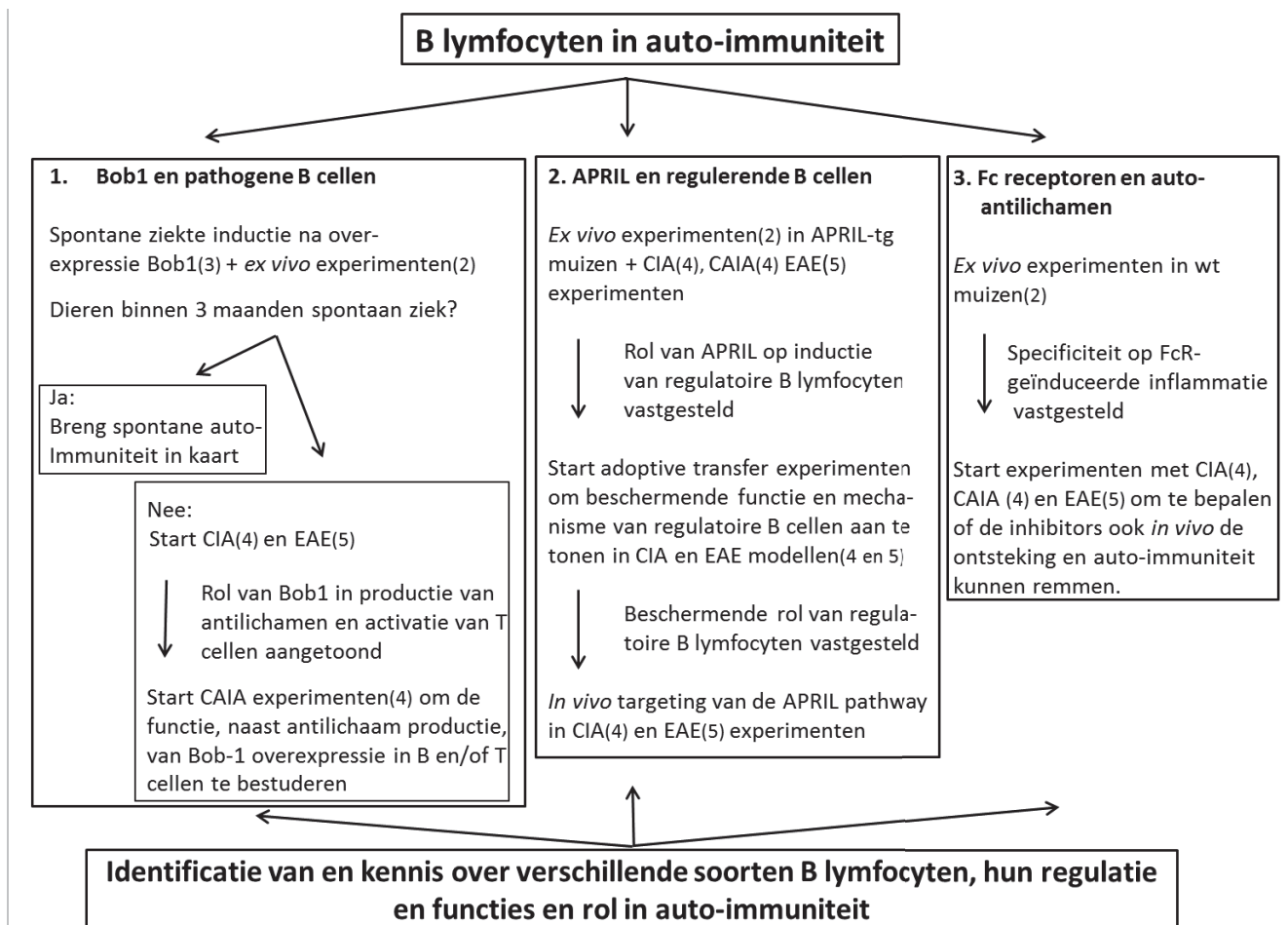
**Subdoel 2/ De rol van APRIL-gemedieerde regulatoire B lymfocyten in auto-immuniteit en de identificatie van het onderliggend mechanisme in deze specifieke B lymfocyten.**

Eerst zal gestart worden met *ex vivo* experimenten met materiaal van wild-type en APRIL-transgene muizen om de effecten van verhoogde APRIL expressie te bepalen op de ontwikkeling en functies van verschillende (regulatoire) B lymfocyt subsets. Ook zullen compounds *ex vivo* worden getest die ingrijpen op de APRIL signalering. Om aan te tonen dat de regulatoire B lymfocyten die geïnduceerd zijn door APRIL een beschermende functie hebben in auto-immuniteit, zullen CIA, CAIA en EAE experimenten worden gebruikt.

Preliminair data hebben aangetoond dat vooral de capaciteit van de APRIL-geïnduceerde B lymfocyten om IL-10 te produceren belangrijk is voor de beschermende effecten in CIA en EAE. Om aan te tonen dat inderdaad de IL-10 productie specifiek door deze B cellen cruciaal is om te beschermen tegen auto-immuniteit, zullen adoptieve transfer experimenten worden ingezet met IL-10 deficiënte B lymfocyten. Om het therapeutische potentieel van APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten te onderzoeken, zullen deze B lymfocyten worden ingespoten als cellulaire therapie in al zieke muizen (CIA en EAE model). Deze experimenten zijn nodig om aan te tonen dat APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten kunnen dienen als mogelijke cellulair therapie in muizen waarin een auto-immuniteit zich al gemanifesteerd heeft. Mocht uit deze experimenten naar voren komen dat regulatoire B lymfocyten beschermen tegen auto-immuniteit, dan zal een selectie van de *ex vivo* geteste compounds *in vivo* worden gebruikt in CIA en EAE modellen om te bestuderen of targeting van de APRIL pathway *in vivo* kan leiden tot inductie van regulatoire B lymfocyten en een verminderd ziektebeeld.

**Subdoel 3/ De immuun activering van macrofagen en microglia door auto-antilichamen.**

Verschiedende inhibitors van Fc receptor signalering zullen *ex vivo* getest worden op muizen cellen. Als uit deze experimenten blijkt dat er geen toxiciteit maar wel specificiteit is (i.e. alleen Fc receptor gemedieerde inflammatie worden geremd, maar niet effecten veroorzaakt door andere receptoren), zal met een selectie van de inhibitors *in vivo* worden getest of deze inhibitors van de specifieke Fc receptoren of hun downstream targets een remmende functie hebben op het ziekteverloop in CIA/CAIA en EAE (in reeds zieke muizen). Aangezien onze data uitwijzen dat de Fc receptor signalering verschilt tussen macrofagen en microglia zullen er andere inhibitors gebruikt worden voor beide ziektemodellen. Deze experimenten zijn bedoeld om te bepalen of remming van Fc receptor signalering gebruikt kan worden als therapie voor RA en/of MS.



**Figuur 1.** Een schematische samenvatting van het gebruikte type dierproeven per subdoel is weergegeven. De cijfers achter de verschillende type dierproeven verwijzen naar het bijlagennummer van het desbetreffende type experiment. Voor subdoel 1 verwachten we maximaal 1080 muizen te gebruiken, voor subdoel 2 zijn dit maximaal 1288 muizen en voor subdoel 3 maximaal 1110 muizen. Het totaal aantal muizen in deze aanvraag bedraagt maximaal 3478 muizen.

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, met als doelstelling het bestuderen van B lymfocyten en auto-antilichamen en hun rol in auto-immuunziekten, is opgedeeld in drie subdoelen:

1. De rol van Bob1 in de ontwikkeling van auto-immuniteit, en specifiek de effecten van Bob1 overexpressie/deficiëntie op B lymfocyt differentiatie en functies.
2. De rol van APRIL-gemedieerde IL-10 producerende B lymfocyten in auto-immuniteit en de identificatie van het onderliggende mechanismen in deze specifieke B lymfocyten.
3. De remming van immuun activering van macrofagen en microglia door auto-antilichamen.

Deze subdoelen hebben gemeenschappelijk dat ze alle drie de rol van B cellen in auto-immuniteit bestuderen, maar de focus van de subdoelen ligt op verschillende moleculaire signaalsystemen en B cel functies, zoals (pathogene) B lymfocyt regulatie door Bob1 in het eerste subdoel en (beschermende) B lymfocyt regulatie door APRIL in het tweede subdoel. De uitvoering van de experimenten binnen elk subdoel kunnen onafhankelijk van de overige subdoelen worden uitgevoerd.

Binnen elk subdoel is enige fasering van toepassing, wat ook zichtbaar is gemaakt in figuur 1. Voor subdoel 1 geldt dat wordt begonnen met het in kaart brengen van de spontane ziekte inductie gedurende

6 maanden bij overexpressie van Bob1 en *ex vivo* experimenten. Zijn de dieren niet ziek geworden binnen 3 maanden, dan pas wordt gestart met CIA en EAE experimenten om de rol van Bob1 op B lymfocyt differentiatie en functies in auto-immuniteit in kaart te brengen. Blijkt dat de dieren wel spontaan ziek worden, gaan we niet door met het induceren van ziekten, maar dan zullen we de spontane ziekteverschijnselen in kaart brengen en uitvoerig bestuderen, zowel *ex vivo* als *in vivo*. Omdat we verhoogde Bob1 expressie gevonden hebben in het synovium van reumatoïde artritis patiënten, zijn we in eerste instantie geïnteresseerd in de rol van Bob1 in het CIA model. We hebben bij een andere auto-immuunziekte, namelijk het syndroom van Sjögren, ook verhoogde Bob1 expressie waargenomen. Daarom denken we dat Bob1 niet alleen een rol speelt in reumatoïde artritis, maar in auto-antilichaam gemedieerde auto-immuunziekten in het algemeen. Dit willen we verifiëren in het EAE model. Om vervolgens te bepalen in welke fase van auto-immuunziekte Bob1 een rol speelt, vergelijken we de effecten van Bob1 overexpressie in het CIA of EAE model, waarin de inductie van de ziekte van belang is, met het CAIA model waarin de onderhoudsfase van de ziekte naar voren komt. Afhankelijk van de resultaten van de CIA en EAE experimenten wordt besloten of de CAIA experimenten noodzakelijk zijn.

Voor het tweede subdoel geldt dat wordt begonnen met *ex vivo* experimenten en *in vivo* experimenten waarin gebruik wordt gemaakt van APRIL-transgene muizen en CIA, CAIA en EAE modellen. EAE en CIA zijn beiden modellen voor auto-immuniteit in de muis, maar zijn verschillend in celtypes die een belangrijke rol spelen bij de inductie van de ziekte: in EAE spelen T en B lymfocyten een belangrijke rol, in CIA is vooral de antilichaam productie van de B lymfocyten belangrijk. Om een compleet beeld van de effecten van APRIL op auto-immuniteit te krijgen, zullen beiden modellen gebruikt worden. Deze experimenten zullen leiden tot kennis over de rol van APRIL in de inductie van regulatoire B lymfocyten en hun mogelijke bescherming tegen auto-immuniteit. CAIA experimenten zullen plaatsvinden om de functie van APRIL op B lymfocyten los van antilichaam productie te onderzoeken. Pas als een beschermende functie van APRIL is vastgesteld, zal gestart worden met adoptieve transfer experimenten waarin de APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten als cellulaire therapie worden ingezet in muizen met CIA en EAE. Mochten deze experimenten succesvol zijn en een beschermende rol van APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten in auto-immuniteit aantonen, dan zal er gestart worden met *in vivo* experimenten waarin de APRIL pathway getarget zal worden met antilichamen/small molecule inhibitors in muizen met CIA en EAE. Dit soort interventies kan mogelijk bijdragen tot de ontwikkeling van nieuwe therapieën toepasbaar op patiënten met RA en MS.

Ook in het derde subdoel zal gestart worden met *ex vivo* experimenten om de specificiteit van Fc receptor-geïnduceerde ontsteking vast te stellen. Ook zal de effectiviteit van remming van deze Fc receptor activering op ontsteking worden vastgesteld. Bij positieve resultaten zal gestart worden met *in vivo* CIA, CAIA en EAE experimenten om de effectiviteit van deze remming van Fc receptor-geïnduceerde ontsteking door small molecule inhibitors vast te stellen. De artritis modellen zijn nodig om de rol van macrofagen en Fc receptor-gemedieerde ontsteking door (auto-)antilichamen tijdens de inductie fase (CIA) en tijdens de onderhoudsfase (CAIA) van de ziekte in kaart te brengen. Het CAIA model wordt ook gebruikt om vast te kunnen stellen in hoeverre de effecten waargenomen met het CIA model afhankelijk zijn van antilichaam productie door de B lymfocyten. Het EAE model is nodig om de rol van microglia en Fc receptor-gemedieerde ontstekingen in de hersenen te onderzoeken. Interventie van ontstekingsreacties door Fc receptor activering kan mogelijk bijdragen tot de ontwikkeling van nieuwe therapieën toepasbaar op patiënten met RA en MS.

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

| Volgnummer | Type dierproef                                   |
|------------|--|
| 1          | Fok met mogelijk ongerief                        |
| 2          | <i>Ex vivo</i> experimenten                      |
| 3          | Spontane ziekte inductie + tamoxifen behandeling |
| 4          | Artritis modellen CIA en CAIA                    |

|    |  |
|----|--|
| 5  | Experimentele autoimmuun encephalomyelitis (EAE) |
| 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

|  |  |                           |
|--|--|---------------------------|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 11800                                  |                           |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Academisch Medisch Centrum - Amsterdam |                           |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer                             | Type dierproef            |
|  | 1                                      | Fok met mogelijk ongerief |

*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 een aantal experimenten, horende bij deze CCD aanvraag, moeten we gebruik maken van dieren met een nog niet beschreven genotype. Van deze dieren is onbekend of zij ongerief ontwikkelen tijdens de fok.

Regulatorie B lymfocyten worden voornamelijk gekenmerkt door hun capaciteit om IL-10 te produceren. In voorgaande experimenten in ons laboratorium hebben we aangetoond dat APRIL transgene muizen gedeeltelijk beschermd zijn tegen auto-immuniteit, gemeten in CIA en EAE protocollen. Ook vonden wij een verhoogd aantal CD5<sup>+</sup> IL-10-producerende B lymfocyten in het peritoneum van de APRIL transgene muizen vergeleken met de controle muizen. Om aan te tonen dat uitsluitend de IL-10 geproduceerd door de APRIL-geïnduceerde B lymfocyten een rol speelt in de bescherming tegen CIA en EAE, gaan we gebruik maken van transfer experimenten met B lymfocyten uit IL-10 deficiënte muizen. De ontvanger muis is deficiënt in B lymfocyten en zal gekruist worden de APRIL-transgene muizen.

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

De B cel deficiënte muizen worden in fok genomen om gekruist te kunnen worden met APRIL transgene muizen. De APRIL tg (+/wt) x B cel knockout (-/-) en APRIL wt (wt/wt) x B cel knockout dieren die uit deze kruising ontstaan worden gebruikt als ontvanger muizen van IL-10 deficiënte B lymfocyten. Een gedetailleerde opzet van deze experimenten is beschreven in bijlagen 4 en 5. De ouderparen worden niet gebruikt in experimenten anders dan de fok.

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

Deze bijlage betreft een fok, dus als onderhoudsfok worden standaard 2 fokkoppels aangehouden in een continue fok om de dieren te behouden.

## B. De dieren

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

B-cel deficiënte C57BL/6 muizen worden aangeschaft bij een commercieel bedrijf en vervolgens gekruist met de APRIL-transgene muizen uit eigen fok. Deze muizen worden als ontvanger muizen gebruikt voor de IL-10 deficiënte B celen. Van deze muizen moet worden vastgesteld of er sprake is van fok met ongerief door deze twee generaties te volgen. Hiervoor zijn 7 mannen en 7 vrouwen nodig. Dus **14** dieren in totaal. Een gedetailleerd schema van de kruisingen is hieronder weergegeven:

Kruising 1: [APRIL<sup>+wt</sup> B-cel<sup>+/-</sup>] x [APRIL<sup>wt/wt</sup> B-cel<sup>-/-</sup>]: start met 4 muizen (2 fokparen)

Nakomelingen: 1. APRIL<sup>wt/wt</sup> x B-cel<sup>+/-</sup> (50%) - fokoverschot  
2. APRIL<sup>+wt</sup> x B-cel<sup>+/-</sup> (50%)

De nakomelingen met het APRIL<sup>+wt</sup> x B-cel<sup>+/-</sup> genotype (50% van de nakomelingen) worden gebruikt om de muizen met het juiste genotype te verkrijgen en gekruist met de ouder [APRIL<sup>wt/wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup>] (voor het sneller verkrijgen van het juiste genotype en reductie van fokoverschot):

Kruising 2: [APRIL<sup>+wt</sup> x B-cel<sup>+/-</sup>] x [APRIL<sup>wt/wt</sup> B-cel<sup>-/-</sup>]

Nakomelingen: 1. APRIL<sup>+wt</sup> x B-cel<sup>+/-</sup> (25%) - fokoverschot  
2. APRIL<sup>+wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup> (25%)  
3. APRIL<sup>wt/wt</sup> x B-cel<sup>+/-</sup> (25%) - fokoverschot  
4. APRIL<sup>wt/wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup> (25%)

50% van deze nakomelingen heeft het juiste genotype (2. APRIL<sup>+wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup> en 4. APRIL<sup>wt/wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup>).

Kruising 3: [APRIL<sup>+wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup>] x [APRIL<sup>wt/wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup>]

Nakomelingen: 1. APRIL<sup>+wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup>  
2. APRIL<sup>wt/wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup>

Alle nakomelingen uit kruising 3 kunnen gebruikt worden in CIA en EAE experimenten zoals beschreven in bijlage 4 en 5, omdat de APRIL<sup>wt/wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup> dienen als controle dieren voor de dieren met het genotype van interesse (1. APRIL<sup>+wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup>). Deze methode zal zorgen voor vermindering van het fokoverschot.

- ➔ 50% van de nakomelingen uit kruising 3 heeft het juiste, onbekende genotype (1. APRIL<sup>+wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup>). Van deze dieren is niet bekend of zij spontaan ongerief ontwikkelen vanwege hun genotype en zullen daarom voor 2 generaties gecheckt worden op het ontstaan van onvoorziene ongerief. Hier worden 7 mannelijke dieren en 7 vrouwelijke dieren voor gebruikt.

We verwachten ongeveer 70 muizen nodig te hebben om 14 dieren (7 man, 7 vrouw) met het juiste genotype te verkrijgen. Er is geen spontaan ongerief beschreven van de muizen met een ander genotype, daardoor deze dieren worden als fokoverschot zonder ongerief beschouwd.

Berekening:

Kruising 1

Fok: 2 mannen x 2 vrouwen = 4 muizen

1 nest per paar met +/-6 pups elk = 12 muizen

Kruising 2

2 fokpaartjes met 2 nakomelingen en 2 originele fokdieren

1 nest per paar met +/- 6 pups elk = 12 muizen

Kruising 3:

2 fokpaartjes met nakomelingen van kruising 2



Uit deze kruising moeten we 7 mannen en 7 vrouwen genereren met als genotype  $APRIL^{+/WT} \times B-cel^{-/-}$ . Per nest krijgen we 50% met het correcte genotype en 50% man cq. 50% vrouw. Indien er 6 pups per nest geboren worden, betekent dat dat er 3 dieren met het correcte genotype zijn. Om 14 dieren te verkrijgen, moeten er  $14 / 3 = 5$  (4.7) nesten geboren worden en dus 30 dieren.

Bij elkaar op geteld hebben we dus voor deze test: 4 fokdieren + 12 muizen (kruising 1) + 12 muizen (kruising 2) + 30 muizen (kruising 3) = 58 muizen nodig. Echter is de berekening met 50% het correcte genotype en 6 pups per nest een schatting (kansberekening), daarom rekenen we dat we **maximaal 70 dieren** nodig hebben om 7 mannen en 7 vrouwen te genereren met het juiste genotype en te controleren op spontaan ongerief.

Indien er inderdaad sprake is van een fok met ongerief, schatten we dat 50% van de fok daadwerkelijk dieren zijn van het genotype met ongerief. We verwachten voor de experimenten beschreven in bijlage 4 en 5 ongeveer 150 ontvanger muizen van 8-10 weken oud nodig te hebben, wat neerkomt op ongeveer 75 dieren die mogelijk ongerief ondervinden van de fok.

### 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 onderhoudsfok van de  $[APRIL^{+/wt} \times B-cel^{-/-}] \times [APRIL^{WT/WT} \times B-cel^{-/-}]$  muizen wordt minimaal gehouden op 2 fokparen. Beide genotypen die ontstaan uit deze kruising kunnen worden gebruikt in experimenten beschreven in bijlage 4 en 5. In de experimenten worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt, waardoor er ook geen fokoverschot ontstaat. Deze experimenten zullen vroeg (binnen 2 jaar na toekenning van de vergunning) worden uitgevoerd. De fok van  $[APRIL^{+/wt} \times B-cel^{-/-}]$  en specifieke B cel deficiënte muizen zal hierdoor niet plaatsvinden gedurende de hele vergunningsperiode.

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.

1/ De dieren worden gehuisvest onder SPF-condities in IVC-kooien om de kans op ongerief zoveel mogelijk te beperken. Bovendien worden de dieren niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden.

2/ Idem bijlage 4 en 5: De dieren worden in een gesloten D1 of, indien nodig vanwege gebruik van compounds, in een DMII omgeving gehuisvest. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## 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?

We voorzien geen welzijnsaantasting voor de [APRIL<sup>+/wt</sup> x Bcel<sup>-/-</sup>] muizen in fok.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

De dieren worden gehuisvest onder SPF condities in IVC-kooien en behandeld in biohazard kasten.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### K. Classificatie van ongerief

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

Licht ongerief.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

[APRIL<sup>+/wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup>] en [APRIL<sup>wt/wt</sup> x B-cel<sup>-/-</sup>] fokparen worden na maximaal 8 maanden gedood om de kans op ongerief vanwege een toenemende leeftijd (ouderdom) zo laag mogelijk te houden.

De B cel deficiënte x APRIL transgene muizen die gebruikt worden in CIA, CAIA en EAE experimenten worden na de duur van het experiment gedood, zoals beschreven staat in bijlage 4 (CIA/CAIA) en 5 (EAE).

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

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

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

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De rol van B lymfocyten in auto-immuniteit, met name RA en MS, is nog niet volledig bekend. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de transcriptiefactor Bob1 en de B cel groeifactor APRIL sterk geassocieerd zijn met RA en effecten hebben op de ontwikkeling van artritis in muizen. De effecten van Bob1 en APRIL op verschillende soorten B lymfocyten en hun functioneren zal onderzocht worden door middel van *ex vivo* experimenten.

De belangrijkste uitkomstparameters voor deze studies zijn effecten van Bob1 en APRIL op:

1. De ontwikkeling van verschillende types B en T lymfocyten
2. Antilichaam productie door de B lymfocyten
3. Antigeen-presentatie van de B lymfocyten
4. De expressie van immuun-modulerende moleculen en de productie van cytokines door B lymfocyten.
5. T lymfocyt proliferatie en cytokine productie

Tevens spelen B lymfocyten een rol bij RA en waarschijnlijk ook bij MS door de productie van auto-antilichamen. Uit onderzoek van zowel ons als van andere groepen blijkt dat deze auto-antilichamen immuuncomplexen kunnen vormen die andere immuun cellen (zoals macrofagen) aanzetten tot een sterke ontstekingsreactie. Het effect van immuuncomplexen op verschillende relevante myeloïde cellen zal ook onderzocht worden door middel van *ex vivo* experimenten. De belangrijkste uitkomstparameters zijn:

1. Differentiatie van macrofagen/microglia.
2. De expressie van immuun-modulerende moleculen en de productie van cytokines door macrofagen/microglia.
3. Metabole veranderingen op cellulair niveau in macrofagen/microglia.

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.

Transgene muizen en controle muizen zijn afkomstig van onze eigen fok, of worden aangekocht via commercieel gerenommeerde fokbedrijven. Voor de *ex vivo* experimenten zal, waar mogelijk, gebruik worden gemaakt van surplus dieren met het juiste genotype (veelal wild type C57BL/6). De muizen worden getermineerd, waarna specifieke organen en/of bloed worden geïsoleerd om experimenten mee te kunnen doen.

De volgende experimenten zullen worden uitgevoerd:

1. Experimenten met geïsoleerde organen (zoals onder andere bot, synovium, lymfeklieren, darm en huid, milt en lymfe knopen):
  - Cel analyse door middel van immunohistochemische kleuringen op coupes, flow cytometrie experimenten en ELISA om verschillende populaties T en B lymfocyten fenotypisch en functioneel te karakteriseren. Voor deze experimenten zullen transgene en wild type controle dieren worden gebruikt.
  - RNA isolatie van specifieke weefselstructuren en cellen om de gen expressie patronen van specifieke moleculen van interesse te detecteren door middel van PCR, qPCR, RNA sequencing of microarray analyse.
2. Experimenten met geïsoleerde cellen:
  - Geïsoleerde cellen uit organen waarin we geïnteresseerd zijn (bijvoorbeeld de milt, beenmerg, lymfeklieren en synovium) worden *in vitro* gekweekt en geanalyseerd met verschillende laboratorium technieken (waaronder FACS, ELISA, cytopins en immunofluorescentie) om het fenotype en de functie te bepalen.

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

Doordat er veel verschillende organen en cellen uit één dier geïsoleerd kunnen worden voor meerdere experimenten, wordt het aantal benodigde dieren sterk beperkt. Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn bekend uit voorgaande studies. Op basis van deze gegevens kan een groeps grootte worden berekend, waarbij het significantieniveau alpha steeds op 0.05 zal worden gesteld. Afhankelijk van de proefopzet zal gebruik worden gemaakt van de Student's T test, de Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA om de groeps grootte te bepalen. Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de gekozen interventie en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

## B. De dieren

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

Voor de studies worden muizen gebruikt.

Er wordt gewerkt met wild type muizen dan wel met specifieke transgene dieren (overexpressie/deficiënte Bob1; APRIL transgene dieren; B-cel deficiënte dieren dan wel Fc receptor deficiënte dieren en humane Fc receptor transgene dieren).

Herkomst van de muizen is aankoop bij een gerenommeerd commercieel fokbedrijf of via eigen fok.

De specifieke Bob1 en APRIL transgene muizen zullen uit eigen fok komen, omdat deze niet commercieel verkrijgbaar zijn. Voor de overige muizen gaat onze voorkeur uit naar gebruik van muizen uit commerciële fokbedrijven.

Levensstadium: 6 tot 14 weken oud.

Geschatte aantallen:

Uit eerdere studies is gebleken dat de meeste vragen beantwoord kunnen worden als 6 muizen per groep gebruikt worden.

Gebaseerd op de overweging dat er 6 experimenten per subdoel per jaar worden ingezet, waarin transgene dieren worden vergeleken met wild-type dieren (2 groepen) per experiment zijn er voor dit type dierproef  $6 \times 5$  (jaren, duur van de aanvraag)  $\times 2$  (groepen)  $\times 6$  (aantal dieren per groep) = 360 dieren per subdoel nodig.

Onze onderzoeksvraag is opgesplitst in 3 subdoelen, dus in totaal zullen er **maximaal 3 \* 360 = 1080 dieren** nodig zijn voor dit type dierproef.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Door het uitvoeren van *ex vivo* experimenten wordt veel informatie verkregen over de regulatie en functie van B cellen oiv Bob1, APRIL en FcR signalering met een relatief klein aantal dieren per experiment, doordat meerdere experimenten (ELISA, flow cytometry en RNA isolatie van gen expressie analyse) ingezet kunnen worden met materiaal afkomstig van één muis. Alle experimenten worden ingezet met het laagst mogelijke aantal dieren om de nul hypothese (geen verschil in groeps gemiddelde tussen de experimentele groep en de controle groep, met een power van 0.8 en alpha 0.05) te kunnen verwerpen.

Gebruik van dieren van commerciële fokbedrijven geeft minder fokoverschot vanwege meer gezamenlijk gebruik met andere onderzoeksinstituten. De specifieke Bob1 en APRIL transgene muizen zullen uit eigen fok komen, omdat deze niet commercieel verkrijgbaar zijn.

Door de kennis opgedaan met *ex vivo* experimenten kunnen de vraagstellingen voor de *in vivo* experimenten nauwkeuriger worden gesteld, wat leidt tot een vermindering van het aantal benodigde dieren voor de *in vivo* experimenten. Dit is bijvoorbeeld het geval in bijlage 4 en 5, waar we onder andere compounds die APRIL signalering induceren willen testen. Mocht uit de *ex vivo* experimenten naar voren komen dat een bepaalde compound geen gewenst effect heeft, dan zal deze compound niet *in vivo* worden getest in CIA en EAE modellen.

Tevens zijn *ex vivo* experimenten verfijnd, omdat er sprake is van minimaal ongerief voor de muizen (enkel terminale anesthesie) en wordt materiaal geïsoleerd uit één muis zo efficiënt mogelijk gebruikt, bijvoorbeeld door meerdere genen of eiwitten te analyseren uit één sample en meerdere type experimenten in te zetten.

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 kans op pijn, lijden of angst wordt beperkt door de dieren enkel terminaal te anestheseren.

Idem bijlage 1 en 3: De dieren zullen in een gesloten D1 omgeving gehuisvest worden. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het MLI- of MLII-lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen experimenten uitgevoerd tijdens het leven van deze dieren, waardoor we geen aantasting in het welzijn van de dieren voorzien. Eventuele stress vanwege de huisvesting zal worden tegengegaan door te voorzien in kooiverrijking (tissues en huisjes) om bescherming te bieden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

N.v.t.

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

Eventuele stress vanwege de huisvesting zal worden tegengegaan door te voorzien in kooiverrijking (tissues en huisjes) om bescherming te bieden.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief wordt ingeschaald als terminaal voor alle dieren.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Verschillende organen en cellen worden geïsoleerd van de dieren om te gebruiken in *ex vivo* experimenten.

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="Spontane ziekte inductie + tamoxifen behandeling"/> |

*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.

Doel van de proef:

Er zijn in dit experiment drie doelen:

1. Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen
2. Het volgen van de dieren gedurende een half jaar om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen na/tijdens tamoxifen toediening.
3. Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies.

Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters:

#### 1 Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen:

Om de Bob1 overexpressie aan te zetten zal toediening van tamoxifen oraal of via intra peritoneale injectie plaatsvinden. Verschillende toedieningsschema's en doseringen worden getest door op verschillende tijden bloed van de dieren af te nemen (max 10 ml/kg per keer, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001) om de efficiëntie van Cre-recombinatie en Bob1 overexpressie te bepalen. Een groep wordt na 1 maand behandeling opgeofferd, en de andere groep na 2 maanden behandeling om de mate van Bob1 overexpressie in de organen te kunnen bepalen. Het toedieningsschema kan dan aangepast worden aan de mate van overexpressie.

#### 2 Het volgen van de dieren gedurende een half jaar om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen na/tijdens tamoxifen toediening:

Voor dit subdoel kijken we naar het ziekteverloop in het gehele organisme. De muizen worden na start van de doorlopende behandeling met tamoxifen maximaal 6 maanden gevolgd om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen. De constante behandeling met tamoxifen is essentieel om de mate van Bob1 overexpressie in de B en T cellen in stand te houden tijdens de vernieuwing van cellen die vanuit het beenmerg plaatsvindt. Gedurende de studie wordt er bloed afgenomen om

te bepalen of Bob1 tot overexpressie komt. De primaire uitkomstparameters zijn afhankelijk van het ziektebeeld dat de muizen ontwikkelen. Standaard parameters die in de gaten gehouden worden tijdens de gehele studie zijn gewicht (als teken van systemische ziekte), diarree, en uiterlijk (vacht, poten, ogen, houding en activiteit). Indien er specifieke symptomen van autoimmuunziekten ontstaan, gaan wij deze scoren. In het geval van artritis, wordt gescoord volgens het CIA model: een score van 0-4 voor iedere poot en een maximumscore van 16 per muis. De scores zijn als volgt gedefinieerd: 0 – normaal, gezond; 1 – milde zwelling van één gewricht; 2 – 2 of meer gewrichten zijn gezwollen; 3 – de gehele poot is gezwollen; 4- het gewricht is vervormd, stijf en kan niet gebruikt worden. In het geval van colitis, wordt er gescoord op de consistentie van de uitwerpselen en de hoeveelheid bloed die daarbij aanwezig is. De uitwerpselen worden als volgt gescoord: normale uitwerpselen: 0; natte uitwerpselen: 1; zachte uitwerpselen: 2; waterige diarree: 3. De aanwezigheid van bloed wordt als volgt gescoord: geen bloed aanwezig: 0; bloederige uitwerpselen en/of bloed rond de anus: 1; ernstige bloedingen: 2. De scores voor uitwerpselen en bloed worden opgeteld om tot een eindscore te komen. In het geval van Psoriasis wordt de roodheid en schilferigheid van de huid gescoord.

Aan het einde van de proef worden de muizen opgeofferd om verschillende organen te bestuderen op mogelijke pathologie.

### **3 Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies *ex vivo*:**

Voor dit subdoel willen we de functionele aspecten van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyten op moleculair niveau in kaart brengen door o.a. te onderzoeken wat de rol is van Bob1 in B cel receptor (BCR) signalering, de capaciteit van de B lymfocyten om het isotype van hun antilichamen te verwisselen, de capaciteit van antigeen presentatie door B lymfocyten, de mate van hulp die T lymfocyten aan B lymfocyten kunnen verstrekken, het meten van cytokines geproduceerd door B en T lymfocyten en of de differentiatie van B en T lymfocyten beïnvloed wordt door veranderde Bob1 expressie. Hiervoor worden muizen blootgesteld aan tamoxifen, en na inductie van overexpressie (zoals getest in doel 1), worden muizen opgeofferd om verdere *ex vivo* proeven uit te voeren.

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. Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen:**

Tamoxifen wordt toegediend in variërende doseringen. Dit zal oraal of via opeenvolgende intra peritoneale injecties plaatsvinden, volgens de richtlijnen beschreven in het Handboek Proefdierkunde (L.F.M. van Zutphen et al. 2012). Hiervoor wordt geen anesthesie gebruikt. De behandeling wordt gestart wanneer de muizen minstens 6 weken oud zijn.

Tijdens de studie wordt op verschillende tijdstippen bloed afgenomen (max volume 10 ml/kg eens per 2 weken, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001) om de efficiëntie van Cre-recombinatie en Bob1 overexpressie te bepalen en de dosering aan te passen. Na 1 en 2 maanden behandeling worden de dieren getermineerd.

#### **2. Het in kaart brengen van het spontane ziekteverloop *in vivo*:**

In eerste instantie vindt de tamoxifen toediening via het voer plaats, maar dit kan later aangepast worden aan de hand van de mate van overexpressie waargenomen in doel 1. De behandeling wordt gestart wanneer de muizen minstens 6 weken oud zijn. De muizen worden na start van de behandeling gedurende maximaal 6 maanden gevolgd om spontane ziekteverschijnselen in kaart te brengen. Standaard parameters die in de gaten gehouden worden tijdens de gehele studie zijn gewicht (als teken van systemische ziekte), diarree, uiterlijk (vacht, poten, ogen, houding) en activiteit.

#### **3. Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies *ex vivo*:**

Om onderzoek te doen naar de functionele aspecten (zoals antigeen presentatie van B lymfocyten en BCR (B cel receptor) signalering) van Bob1 overexpressie middels *ex vivo* experimenten, worden muizen korte tijd (maximaal 2 maanden) behandeld met tamoxifen om Bob1 overexpressie te initiëren, waarna ze opgeofferd worden voordat eventuele spontane ziekteontwikkeling optreedt.

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

#### **1. Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen:**

Gebaseerd op literatuur betreffende enkele Cre-ERT2 muislijnen (Boross Genesis 2009; Aghajani Genesis 2012), zijn 3 muizen per Cre-lijn voldoende om de effectiviteit van de Cre-Recombinase vast te stellen. We willen twee toedieningsschema's met elkaar vergelijken (oraal versus intra peritoneaal), wat neerkomt op 6 muizen. De bob1 overexpressie zal geanalyseerd worden na 1 maand en na 2 maanden. Dit komt neer op een totaal van 12 muizen per Cre lijn.

Nadat het optimale toedieningsschema bepaald is voor de eerste Cre-lijn, zal dit schema eerst getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.

## **2. Het in kaart brengen van het spontane ziekteverloop *in vivo*:**

Er is nog geen kennis over de Bob1 overexpressie muislijn, dus het is onmogelijk een accurate inschatting te maken van het aantal dieren dat spontaan ziek zal worden in de 6 maanden dat ze gevolgd worden voor subdoel 2. Er wordt gebruik gemaakt van 12 dieren per groep, gebaseerd op een andere studie waar ook het spontane ziekteverloop in transgene muizen werd bestudeerd (Sardjono; Arthritis & Rheumatism 2005). 28% van de transgene muizen ontwikkelde spontaan artritis. Met een groepsgrootte van 12 dieren zullen 4 dieren spontaan ziek worden als we deze incidentie toepassen. Echter, in de studie van Sardjono et al is een heel ander transgeen bestudeerd, dus de resultaten zijn niet direct vergelijkbaar.

Afhankelijk van het ontstaan van spontane ziekte zullen we de muizen behandelen:

1. Geen spontaan ziektebeeld/een licht ziektebeeld na 3 maanden:  
De muizen zullen gevolgd worden tot 6 maanden na toediening van tamoxifen om eventuele ziekteontwikkeling na de eerste 3 maanden waar te kunnen nemen. Omdat de muizen na 3 maanden geen of lichte ziekte vertonen, wordt artritis en EAE geïnduceerd in 6-8 weken oude muizen zoals beschreven in respectievelijk bijlage 4 en 5. Onder een licht ziektebeeld verstaan we symptomen waarvan we verwachten dat ze geen of nauwelijks invloed hebben op het behalen van de humane eindpunten beschreven voor de artritis en EAE modellen.
2. Ontwikkeling van een ernstig ziektebeeld binnen 3 maanden:  
Het volgen van de dieren wordt stopgezet na 3 maanden, het is niet nodig om de muizen langer te volgen als onze onderzoeksvraag al beantwoord is na 3 maanden na tamoxifen toediening. Ook vindt er geen inductie van EAE en CIA plaats, omdat het niet mogelijk is om de rol van Bob1 op B en T lymfocyten en auto-immuniteit goed te bestuderen in al zieke dieren. Dit omdat het niet valt uit te sluiten dat de EAE en artritis modellen beïnvloed worden door de spontane ziekte, waardoor er geen conclusies over de rol van Bob1 in auto-immuniteit getrokken kunnen worden.

## **3. Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies *ex vivo*:**

Voor subdoel 3 is het aantal dieren met n=6 per groep voldoende om B en T cel functies *ex vivo* te kunnen bestuderen. Dit is gebaseerd op onze eerder ervaringen met andere muislijnen waarin cellulaire functies bestudeerd zijn.

Na het afronden van de proeven van subdoel 1 en eventueel subdoel 2 zullen we meer kennis hebben over het patroon van overexpressie in dit model, wat ons in staat stelt om het aantal benodigde dieren nauwkeuriger te berekenen in volgende experimenten.

## **B. De dieren**

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

Voor de studies worden muizen gebruikt. Muizen zijn gekenmerkt door een goede inductie van de artritis (bijlage 4) en multiple sclerose model (bijlage 5) die gebruikt worden in navolging van deze dierproef. Er wordt gewerkt met wild type muizen, dan wel met specifieke transgene dieren (overexpressie van Bob1 in verschillende celtypes) uit eigen fok.

Voor dit model worden muizen van eigen fok gekruist met Cre-ERT2 lijnen van gerenommeerde fokbedrijven om het mogelijk te maken overexpressie van Bob1 in B en T lymfocyten te initiëren.

Levensstadium: 6 weken tot max 8 maanden oud. Beide geslachten zullen worden gebruikt.

Geschatte aantallen per doel:

### **1. Het bepalen van optimale tamoxifen toediening:**

Dit moet voor iedere gebruikte Cre-lijn getest worden. Per diergroep zijn 12 dieren nodig, waarvan de helft na 1 maand opgeofferd wordt en de andere helft na twee maanden. Het betreft hier één tot twee B lymfocyt specifieke Cre muizen, en één tot twee T lymfocyt specifieke Cre muizen. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. Dit komt neer op **maximaal 96 dieren** voor dit doel.

Nadat het optimale toedieningsschema bepaald is voor de eerste lijn, zal dit schema eerst getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere

lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.

## 2. Het in kaart brengen van het spontane ziekteverloop:

Per diergroep zijn 12 dieren nodig. Het betreft hier één tot twee lijnen met B lymfocyt specifieke Cre expressie, en één tot twee lijnen met T lymfocyt specifieke Cre expressie. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. Dit komt neer op **maximaal 96 dieren** voor dit doel.

## 3. Het in kaart brengen van functionele aspecten van Bob1 overexpressie middels *ex vivo* experimenten:

Per diergroep zijn 6 experimentele en 6 controledieren nodig. Het betreft hier één tot twee lijnen met B lymfocyt specifieke Cre expressie, en één tot twee lijnen met T lymfocyt specifieke Cre expressie. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. We willen de rol van Bob1 overexpressie in verschillende functionele aspecten van B en T lymfocyten onderzoeken:

- A. B cel receptor (BCR) signalering
- B. Isotype verandering van antilichamen in B lymfocyten
- C. Antigeen presentatie door B lymfocyten aan T lymfocyten
- D. Hulp die T lymfocyten aan B lymfocyten verstrekken
- E. Cytokines geproduceerd door B en T lymfocyten
- F. Differentiatie van B en T lymfocyten in verschillende kweekcondities.

Voor elk doel binnen subdoel 3 gebruiken we 12 dieren per Cre muislijn, inclusief controledieren. In doelen A en B kijken we alleen naar de effecten van Bob1 overexpressie op B cellen, hiervoor gebruiken we beide B cel Cre lijnen. Dit komt neer op  $2 \times 12 = 24$  muizen. Omdat het om 2 doelen gaat (A-B), hebben we  $2 \times 24 = 48$  muizen nodig.

In doelen C-F willen we zowel B als T lymfocyten bestuderen. Hiervoor gebruiken alle 4 de Cre muislijnen. Dit komt neer op  $4 \times 12 = 48$  muizen. We hebben 4 verschillende doelen die we willen bestuderen (C-F), dus zijn er  $4 \times 48 = 192$  muizen nodig.

In totaal hebben we  $48 + 192 = 240$  muizen nodig voor subdoel 3.

**Het totaal aantal dieren voor deze bijlage bedraagt maximaal  $2 \times 96 + 240 = 432$  muizen.**

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging is in dit geval niet mogelijk. Om het ontstaan van systemische auto-immuunziekten te onderzoeken is het organisme in zijn geheel nodig omdat buiten B en T lymfocyten nog andere cellen en weefsels een rol spelen bij het ontstaan van ziekte. Er zijn geen *ex vivo* systemen beschikbaar die de complexe interacties van het immuun systeem tijdens de ontwikkeling van auto-immuniteit goed nabootsten.

Vermindering van proefdieren wordt bewerkstelligd met dit protocol door meerdere uitkomstparameters te analyseren in één dier. Zo wordt voorkomen dat meerdere studieprotocollen nodig zijn. Gebruik van het weefsel na afloop van de experimenten is zoveel mogelijk geoptimaliseerd, zodat histologie, flowcytometrie, het meten van materiaal (bv cytokines) in serum en isolatie van RNA voor gen expressie analyse (uit verschillende organen) van hetzelfde dier mogelijk is. Zo wordt het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk teruggebracht. Daarnaast verminderen het aantal benodigde dieren door het optimale toedieningsschema van Cre eerst te bepalen in 1 Cre-lijn (doel 1). Hierdoor kan het geoptimaliseerde schema getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere

lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.

Verfijning wordt bewerkstelligd door de dieren goed in de gaten te houden om ongerief te beperken. Bij signalen van verzwakte dieren door ontwikkeling van spontane auto-immuunziekte en/of ziekteverschijnselen zal geweekt voer op de bodem van de kooi geplaatst worden. Wanneer nodig, volgens de humane eindpunten, wordt een dier vroegtijdig uit de proef gehaald.

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.

1/ Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. Om ontwikkeling van spontane ziekte te kunnen monitoren zullen de dieren minimaal 1 keer per week gecontroleerd worden. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden. Zodra gewichtsverlies wordt waargenomen, wordt gel voor vocht en geweekt voer aangeboden op de bodem van de kooi. Wanneer een afwijkende activiteit of uiterlijk wordt geconstateerd, zullen de muizen vaker gewogen en geïnspecteerd worden (max 3 keer per week) om het ziektebeeld beter in kaart te kunnen brengen, en veranderingen in het gewicht nauwkeuriger te kunnen observeren.

2/ Idem bijlage 2: De dieren worden in een gesloten D1 omgeving gehuisvest. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het MLI of MLII-lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Anesthesie is niet nodig voor de inductie van dit model. We weten niet of dit model spontaan ziekte induceert en ongerief met zich mee brengt, daarom worden deze experimenten uitgevoerd.

Indien er toch ernstig ongerief optreedt zoals beschreven bij de humane eindpunten, worden de dieren uit de proef gehaald.

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

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1/ Tamoxifen toediening oraal of intraperitoneaal.  
2/ Bloedafname tijdens het experiment.  
3/ Euthanasie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Alle beschreven vormen van welzijnsaantasting zijn verbonden met het beschreven diermodel en kunnen dus niet voorkomen worden.

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

Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden. Zodra ziekte ontwikkelt wordt gel voor vocht en geweekt voer met dezelfde consistentie als het normale voer aangeboden op de bodem van de kooi. Bij te ernstig ongerief wordt het dier uit de proef gehaald. Dit wordt bepaald aan de hand van de humane eindpunten vermeld bij punt J.

## 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.

Aangezien er nog geen kennis is over het mogelijke ongerief in dit model en de specifieke symptomen die hierbij zullen horen, wordt gewichtsverlies gebruikt als teken van ontstaan van systemische auto-immuunziekten.

In de eerste week na orale tamoxifen toediening kan gewichtsverlies optreden.

Gewichtsverlies na deze eerste week wordt gebruikt als een signaal voor systemische ziekte. Een verlies van 15% in ten opzichte van het hoogste gemeten gewicht, of twee maal achtereenvolgend 10% gewichtsverlies worden gebruikt als humane eindpunten.

Verder wordt er gelet op het uiterlijk en de activiteit van de dieren. Een openstaande vacht en verminderde of afwijkende activiteit worden genoteerd en zijn een indicatie om vaker te gaan wegen (max 3 keer per week) om veranderingen in het gewicht nauwkeuriger te kunnen bijhouden.

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

Deze muizen zijn nog niet eerder gebruikt, dus het is onbekend hoeveel van de muizen deze criteria zullen halen. In onze *ex vivo* experimenten hebben we aangetoond dat Bob1 belangrijk is voor het functioneren van germinal centers die belangrijk zijn in de adaptieve immuun respons. We verwachten dat deze dieren in een SPF omgeving weinig activatie van hun adaptieve immuunsysteem ondervinden en er daardoor geen

symptomen van spontane autoimmuunziekte waargenomen worden.

### 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. Deze dieren zijn nog nooit bestudeerd, en we weten dus niet of Bob1 overexpressie leidt tot spontane ziekteverschijnselen, of wat de aard van deze symptomen zal zijn.

De dieren hebben in ieder geval matig ongerief vanwege de tamoxifen behandelingen. Omdat het adaptieve immuunsysteem in een SPF omgeving weinig activatie zal ondervinden, achten wij de kans op het ontstaan van spontane auto-immuniteit door Bob1 overexpressie klein. Echter moet er rekening gehouden worden met de kans dat deze dieren wel spontaan auto-immuunziekte ontwikkelen wat mogelijk kan leiden tot ernstig ongerief.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Voor doel 1 om te kunnen beoordelen of Cre recombinatie voldoende heeft plaatsgevonden en Bob1 overexpressie voldoende aanwezig is.

Voor doel 2 om pathologische/histologische analyse op de weefsels uit te voeren.

Voor doel 3 om cellen te verkrijgen voor functionele *ex vivo* analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="Spontane ziekte inductie + tamoxifen behandeling"/> |

*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.

Doel van de proef:

Er zijn in dit experiment drie doelen:

1. Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen
2. Het volgen van de dieren gedurende een half jaar om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen na/tijdens tamoxifen toediening.
3. Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies.

Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters:

- 1 Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen:  
Om de Bob1 overexpressie aan te zetten zal toediening van tamoxifen oraal of via intra peritoneale injectie plaatsvinden. Verschillende toedieningsschema's en doseringen worden getest door op verschillende tijden bloed van de dieren af te nemen (max 10ml/kg per keer, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001) om de efficiëntie van Cre-recombinatie en Bob1 overexpressie te bepalen. Enkele dieren (max 12 per groep) worden na 1 of 2 maanden behandeling opgeofferd om de mate van Bob1 overexpressie in de organen te kunnen bepalen. Het toedieningsschema kan dan aangepast worden aan de mate van overexpressie.
- 2 Het volgen van de dieren gedurende een half jaar om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen na/tijdens tamoxifen toediening:  
Voor dit subdoel kijken we naar het ziekteverloop in het gehele organisme. De muizen worden na start van de doorlopende behandeling met tamoxifen maximaal 6 maanden gevolgd om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen. De constante behandeling met tamoxifen is essentieel om de mate van Bob1 overexpressie in de B en T cellen in stand te houden tijdens de vernieuwing van cellen die vanuit het beenmerg plaatsvindt. Gedurende de studie wordt er bloed afgenomen om



te bepalen of Bob1 tot overexpressie komt. De primaire uitkomstparameters zijn afhankelijk van het ziektebeeld dat de muizen ontwikkelen. Standaard parameters die in de gaten gehouden worden tijdens de gehele studie zijn gewicht (als teken van systemische ziekte), diarree, en uiterlijk (vacht, poten, ogen, houding en activiteit). Indien er specifieke symptomen van autoimmuunziekten ontstaan, gaan wij deze scoren. In het geval van artritis, wordt gescoord volgens het CIA model: een score van 0-4 voor iedere poot en een maximumscore van 16 per muis. De scores zijn als volgt gedefinieerd: 0 – normaal, gezond; 1 – milde zwelling van één gewricht; 2 – 2 of meer gewrichten zijn gezwollen; 3 – de gehele poot is gezwollen; 4- het gewricht is vervormd, stijf en kan niet gebruikt worden. In het geval van colitis, wordt er gescoord op de vorm van de uitwerpselen en de hoeveelheid bloed die daarbij aanwezig is. De uitwerpselen worden als volgt gescoord: normale uitwerpselen: 0; natte uitwerpselen: 1; zachte uitwerpselen: 2; waterige diarree: 3. De aanwezigheid van bloed wordt als volgt gescoord: geen bloed aanwezig: 0; bloederige uitwerpselen en/of bloed rond de anus: 1; ernstige bloedingen: 2. De scores voor uitwerpselen en bloed worden opgeteld om tot een eindscore te komen. In het geval van Psoriasis wordt de roodheid en schilferigheid van de huid gescoord.

Aan het einde van de proef worden de muizen opgeofferd om verschillende organen te bestuderen op mogelijke pathologie.

- 3 Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies *ex vivo*:  
Voor dit subdoel willen we de functionele aspecten van Bob1 overexpressie in B en T cellen op moleculair niveau in kaart brengen door o.a. te onderzoeken wat de rol is van Bob1 in B cel receptor (BCR) signalering, de capaciteit van de B lymfocyten om het isotype van hun antilichamen te verwisselen, de capaciteit van antigeen presentatie door de B lymfocyten, de mate van hulp die T lymfocyten aan B lymfocyten kunnen verstrekken, het meten van cytokines geproduceerd door B en T lymfocyten en of de differentiatie van B en T lymfocyten beïnvloed wordt door veranderde Bob1 expressie. Hiervoor worden muizen blootgesteld aan tamoxifen, en na inductie van overexpressie (zoals getest in doel 1), worden muizen opgeofferd om verdere *ex vivo* proeven uit te kunnen voeren.

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. Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen:

Tamoxifen wordt toegediend in variërende doseringen. Dit zal oraal of via opeenvolgende intra peritoneale injecties plaatsvinden, volgens de richtlijnen beschreven in het Handboek Proefdierkunde (L.F.M. van Zutphen et al. 2012). Hiervoor wordt geen anesthesie gebruikt. De behandeling wordt gestart wanneer de muizen minstens 6 weken oud zijn.

Tijdens de studie wordt op verschillende tijdstippen bloed afgenomen (max volume 8ml/kg eens per 2 weken, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001) om de efficiëntie van Cre-recombinatie en Bob1 overexpressie te bepalen en de dosering aan te passen. Na 1 en 2 maanden behandeling worden de dieren getermineerd.

2. Het in kaart brengen van het spontane ziekteverloop *in vivo*:

In eerste instantie vindt de tamoxifen toediening via het voer plaats, maar dit kan later aangepast worden aan de hand van de mate van overexpressie waargenomen in doel 1. De behandeling wordt gestart wanneer de muizen minstens 6 weken oud zijn. De muizen worden na start van de behandeling gedurende maximaal 6 maanden gevolgd om spontane ziekteverschijnselen in kaart te brengen. Standaard parameters die in de gaten gehouden worden tijdens de gehele studie zijn gewicht (als teken van systemische ziekte), diarree, uiterlijk (vacht, poten, ogen, houding) en activiteit.

3. Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies *ex vivo*:

Om onderzoek te doen naar de functionele aspecten (zoals antigeen presentatie van B lymfocyten en BCR (B cel receptor) signalering) van Bob1 overexpressie middels *ex vivo* experimenten, worden muizen korte tijd behandeld met tamoxifen om Bob1 overexpressie te initiëren, waarna ze opgeofferd worden voordat eventuele spontane ziekteontwikkeling optreedt.

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

Gebaseerd op literatuur betreffende enkele Cre-ERT2 muislijnen (Boross Genesis 2009; Aghajani Genesis 2012), zijn 12 muizen per Cre-lijn voldoende om de effectiviteit van de Cre-Recombinase vast te stellen over een periode van twee maanden voor subdoel 1. De helft van de dieren (6) wordt na 1 maand opgeofferd om Bob1 expressie *ex vivo* te controleren, de andere helft van de dieren (6) wordt na 2

maanden opgeofferd. We willen twee toedieningsschema's met elkaar vergelijken (oraal versus intra peritoneaal), wat uiteindelijk dus neerkomt op 3 dieren per groep. Uit eerdere studies is gebleken dat de vraag of Cre tot expressie komt beantwoord kan worden als 3 muizen per groep worden gebruikt (Boross Genesis 2009; Aghajani Genesis 2012). Nadat het optimale toedieningsschema bepaald is voor de eerste Cre-lijn, zal dit schema eerst getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.

Er is nog geen kennis over de Bob1 overexpressie muislijn, dus het is onmogelijk een accurate inschatting te maken van het aantal dieren dat spontaan ziek zal worden in de 6 maanden dat ze gevolgd worden voor subdoel 2. Er wordt gebruik gemaakt van 12 dieren per groep, gebaseerd op een andere studie waar ook het spontane ziekteverloop in transgene muizen werd bestudeerd (Sardjono; Arthritis & Rheumatism 2005). 28% van de transgene muizen ontwikkelde spontaan artritis. Met een groepsgrootte van 12 dieren zullen 4 dieren spontaan ziek worden als we deze incidentie toepassen. Echter, in de studie van Sardjono et al is een heel ander transgeen bestudeerd, dus de resultaten zijn niet direct vergelijkbaar.

Afhankelijk van het ontstaan van spontane ziekte zullen we de muizen behandelen:

1. Geen spontaan ziektebeeld na 3 maanden:  
De muizen zullen gevolgd worden tot 6 maanden na toediening van tamoxifen om eventuele ziekteontwikkeling na de eerste 3 maanden waar te kunnen nemen. Een deel van de muizen wordt gebruikt in de CIA en EAE modellen (respectievelijk bijlage 4 en 5) om de effecten van Bob1 op geïnduceerde auto-immuunziekten te bestuderen.
2. Ontwikkeling van een licht ziektebeeld na 3 maanden:  
De muizen zullen gevolgd worden tot 6 maanden na toediening van tamoxifen en goed gecontroleerd op verergering van het spontane ziektebeeld. Een deel van de muizen wordt gebruikt in de CIA en EAE modellen (respectievelijk bijlage 4 en 5) om de effecten van Bob1 op geïnduceerde auto-immuunziekten te bestuderen.
3. Ontwikkeling van een ernstig ziektebeeld na 3 maanden:  
Het volgen van de dieren wordt stopgezet na 3 maanden, het is niet nodig om de muizen langer te volgen als onze onderzoeksvraag al beantwoord is na 3 maanden na tamoxifen toediening. Ook vindt er geen inductie van EAE en CIA plaats, omdat we in het spontane model de effecten van Bob1 overexpressie op ontstekingen en auto-immuniteit kunnen bestuderen.

Voor subdoel 3 is het aantal dieren met n=6 per groep voldoende om B en T cel functies *ex vivo* te kunnen bestuderen. Dit is gebaseerd op onze eerder ervaringen met andere muislijnen waarin cellulaire functies bestudeerd zijn.

Na het afronden van de proeven van subdoel 1 en eventueel subdoel 2 zullen we meer kennis hebben over het patroon van overexpressie in dit model, wat ons in staat stelt om het aantal benodigde dieren nauwkeuriger te berekenen in volgende experimenten.

## B. De dieren

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

Voor de studies worden muizen gebruikt. Muizen zijn gekenmerkt door een goede inductie van de artritis (bijlage 4) en multiple sclerose model (bijlage 5) die gebruikt worden in navolging van deze dierproef. Er wordt gewerkt met wild type muizen, dan wel met specifieke transgene dieren (overexpressie van Bob1 in verschillende celtypes) uit eigen fok.

Voor dit model worden muizen van eigen fok gekruist met Cre-ERT2 lijnen van gerenommeerde fokbedrijven om het mogelijk te maken overexpressie van Bob1 in B en T cellen te initiëren.

Levensstadium: 6 weken tot max 8 maanden oud. Beide geslachten zullen worden gebruikt.

Geschatte aantallen per doel:

1. Het bepalen van optimale tamoxifen toediening:

Dit moet voor iedere gebruikte Cre-lijn getest worden. Per diergroep zijn 12 dieren nodig, waarvan de helft na 1 maand opgeofferd wordt en de andere helft na twee maanden. Het betreft hier één tot twee B lymfocyt specifieke Cre muizen, en één tot twee T lymfocyt specifieke Cre muizen. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. Dit komt neer op **maximaal 96 dieren** voor dit doel. Nadat het optimale toedieningsschema bepaald is voor de eerste lijn, zal dit schema eerst getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.

2. Het in kaart brengen van het spontane ziekteverloop:

Per diergroep zijn 12 dieren nodig. Het betreft hier één tot twee lijnen met B lymfocyt specifieke Cre expressie, en één tot twee lijnen met T lymfocyt specifieke Cre expressie. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. Dit komt neer op **maximaal 96 dieren** voor dit doel.

3. Het in kaart brengen van functionele aspecten van Bob1 overexpressie middels *ex vivo* experimenten:

Per diergroep zijn 6 experimentele en 6 controledieren nodig. Het betreft hier één tot twee lijnen met B lymfocyt specifieke Cre expressie, en één tot twee lijnen met T lymfocyt specifieke Cre expressie. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. We willen de rol van Bob1 overexpressie in verschillende functionele aspecten van B en T lymfocyten onderzoeken:

- B cel receptor (BCR) signalering
- Isotype verandering in B lymfocyten
- Antigeen presentatie door B lymfocyten aan T lymfocyten
- Hulp die T lymfocyten aan B lymfocyten verstrekken
- Cytokines geproduceerd door B en T lymfocyten
- Differentiatie van B en T lymfocyten in verschillende kweekcondities

Voor elk doel gebruiken we 12 dieren per muislijn, inclusief controledieren. Dit komt neer op 48 dieren per vraagstelling waarin B en T lymfocyten van belang zijn (4) en 24 dieren voor de vraagstellingen over B lymfocyten (2). Dit komt neer op  $48 * 4 + 24 * 2 =$  **maximaal 240 dieren** voor dit doel.

Het totaal aantal dieren voor deze bijlage bedraagt maximaal  $2 * 96 + 240 =$  **432 muizen**.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging is in dit geval niet mogelijk. Om het ontstaan van systemische auto-immuunziekten te onderzoeken is het organisme in zijn geheel nodig omdat buiten B en T lymfocyten nog andere cellen en weefsels een rol spelen bij het ontstaan van ziekte. Er zijn geen *ex vivo* systemen beschikbaar die de complexe interacties van het immuun systeem tijdens de ontwikkeling van auto-immuniteit goed nabootsten.

Vermindering van proefdieren wordt bewerkstelligd met dit protocol door meerdere uitkomstparameters te analyseren in één dier. Zo wordt voorkomen dat meerdere studieprotocollen nodig zijn. Gebruik van het weefsel na afloop van de experimenten is zoveel mogelijk geoptimaliseerd, zodat histologie, flowcytometrie, het meten van materiaal (bv cytokines) in serum en isolatie van RNA voor gen expressie analyse (uit verschillende organen) van hetzelfde dier mogelijk is. Zo wordt het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk teruggebracht. **Daarnaast verminderen het aantal benodigde dieren door het optimale toedieningsschema van Cre eerst te bepalen in 1 Cre-lijn (doel 1). Hierdoor kan het geoptimaliseerde schema getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.**

Verfijning wordt bewerkstelligd door de dieren goed in de gaten te houden om ongerief te beperken. Bij signalen van verzwakte dieren door ontwikkeling van spontane auto-immuunziekte en/of ziekteverschijnselen zal geweekt voer op de bodem van de kooi geplaatst worden. Wanneer nodig, volgens de humane eindpunten, wordt een dier vroegtijdig uit de proef gehaald.

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.

1/ Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. Om ontwikkeling van spontane ziekte te kunnen monitoren zullen de dieren minimaal 1 keer per week gecontroleerd worden. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden. Zodra ziekte ontwikkelt wordt gel voor vocht en geweekt voer met dezelfde consistentie als het normale voer aangeboden op de bodem van de kooi.

2/ Idem bijlage 2: De dieren worden in een gesloten D1 omgeving gehuisvest. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het MLI of MLII-lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Anesthesie is niet nodig voor de inductie van dit model. We weten niet of dit model spontaan ziekte induceert en ongerief met zich mee brengt, daarom worden deze experimenten uitgevoerd.

Indien er toch ernstig ongerief optreedt zoals beschreven bij de humane eindpunten, worden de dieren uit de proef gehaald.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1/ Tamoxifen toediening oraal of intraperitoneaal.
- 2/ Bloedafname tijdens het experiment.
- 3/ Euthanasie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Alle beschreven vormen van welzijnsaantasting zijn verbonden met het beschreven **diermodel** en kunnen dus niet voorkomen worden.

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

Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden. Zodra ziekte ontwikkelt wordt gel voor vocht en geweekt voer met dezelfde consistentie als het normale voer aangeboden op de bodem van de kooi. Bij te ernstig ongerief wordt het dier uit de proef gehaald. Dit wordt bepaald aan de hand van de humane eindpunten vermeld bij punt J.

### 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.

Aangezien er nog geen kennis is over het mogelijke ongerief in dit model en de specifieke symptomen die hierbij zullen horen, wordt gewichtsverlies gebruikt als teken van ontstaan van systemische auto-immuunziekten.

In de eerste week na orale tamoxifen toediening kan gewichtsverlies optreden.

Gewichtsverlies na deze eerste week wordt gebruikt als een signaal voor systemische ziekte. Een verlies van 15% in ten opzichte van het hoogste gemeten gewicht), of twee maal achtereenvolgend 10% gewichtsverlies worden gebruikt als humane eindpunten.

Verder wordt er gelet op het uiterlijk en de activiteit van de dieren. Een opstaande vacht en verminderde of afwijkende activiteit worden genoteerd en indien dit aanhoudt (in combinatie met gewichtsverlies) worden de dieren uit de proef gehaald.

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

Deze muizen zijn nog niet eerder gebruikt, dus het is onbekend hoeveel van de muizen deze criteria zullen halen. In onze *in vitro* experimenten hebben we aangetoond dat Bob1 belangrijk is voor het functioneren van germinal centers die belangrijk zijn in de adaptieve immuun respons. We verwachten dat deze dieren in een SPF omgeving weinig activatie van hun adaptieve immuunsysteem ondervinden en er daardoor geen symptomen van spontane autoimmuunziekte waargenomen worden.

### 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.** Deze dieren zijn nog nooit bestudeerd, en we weten dus niet of Bob1 overexpressie leidt tot spontane ziekteverschijnselen, of wat de aard van deze symptomen zal zijn.

We verwachten matig ongerief vanwege de tamoxifen behandelingen. Omdat het adaptieve immuunsysteem

in een SPF omgeving weinig activatie zal ondergaan, achten wij de kans op het ontstaan van spontane auto-immuniteit door Bob1 overexpressie klein. We verwachten geen symptomen en ongerief. Echter moet er rekening gehouden worden met de kans dat deze dieren wel spontaan auto-immuunziekte ontwikkelen wat kan leiden tot ernstig ongerief. Dit ongerief is niet acuut, maar is afkomstig van een opbouwende auto-immuunziekte. Met in achtneming van de humane eindpunten wordt in maximaal 5% van de dieren ernstig ongerief verwacht.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Voor doel 1 om te kunnen beoordelen of Cre recombinatie voldoende heeft plaatsgevonden en Bob1 overexpressie voldoende aanwezig is.

Voor doel 2 om pathologische/histologische analyse op de weefsels uit te voeren.

Voor doel 3 om cellen te verkrijgen voor functionele *ex vivo* analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage Beschrijving dierproeven

8

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 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="Artritis modellen (CIA en CAIA)"/> |

*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.

Afhankelijk van onze vraagstellingen maken we gebruik van twee artritis modellen.

Het eerste model is collageen-geïnduceerde artritis (CIA). Dit is een veelvuldig beschreven model waarin muizen geïmmuniseerd worden met collageen om uiteindelijk artritis te ontwikkelen (Bevaart L. et al., *Methods Mol Biol.*, 2010; 602:181-92). Het model is afhankelijk van B en T lymfocyten; muizen zonder T lymfocyten (Wooley et al., *J. Exp. Med.* 1981; 154:688) of B lymfocyten (Svensson et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1998; 111:521) zijn volledig beschermd tegen de ontwikkeling van artritis.

Het CIA model zal gebruikt worden in verschillende muislijnen om vragen te beantwoorden met betrekking tot het functioneren van het immuunsysteem, met name B lymfocyten, in de inductie en onderhoudsfase van artritis.

Het tweede model is collageen-antilichaam geïnduceerde artritis (CAIA). Dit is een goed bestudeerd en beschreven model met een passieve transfer van een mix van collageen type II-specifieke antilichamen, dat leidt tot een snelle, uitgesproken artritis inductie in muizen (Nandakumar and Holmdahl, *Journal of Immunol. Methods*, 2005; 304:126-136).

Met het CAIA model als secundair model voor artritis kunnen we onderscheid maken in de rol die B lymfocyten spelen in de inductiefase (CIA) versus de onderhoudsfase (CAIA). In het CIA model wordt geïmmuniseerd, waarna de B lymfocyten anti-collageen antilichamen gaan produceren die gewrichtsontstekingen veroorzaken (inductiefase). In het CAIA model worden antilichamen tegen collageen ingespoten, waardoor het proces van antilichaam productie door B lymfocyten *in vivo* wordt overgeslagen.

Behandeling met antilichamen of small molecule inhibitors:

Er worden experimenten uitgevoerd waarin signaleringsmoleculen belangrijk in de inductie en/of activatie

van regulatoire B lymfocyten en de activering van Fc-receptor signalering worden getarget. Targeting van deze pathways via antilichamen of small molecule inhibitors gedurende CIA experimenten zal leiden tot kennis over de functies van regulatoire B lymfocyten en activatie van de Fc-receptor signalering in artritis en levert resultaten over de mogelijke klinische relevantie van interventies op deze signaleringsmoleculen voor RA patiënten.

CIA en CAIA experimenten na adoptieve transfer (bijvoorbeeld na transfer van IL-10 deficiënte B cellen): Het doel van dit type dierproef is om de bijdrage van bepaalde type T en/of B lymfocyten in de ontwikkeling van auto-immuunziekten, specifiek RA, te achterhalen door deze cellen systemisch in te spuiten in muizen met artritis. Daarnaast zullen adoptieve transfer experimenten worden gebruikt om het therapeutische potentieel van APRIL-geïnduceerde regulatoire B cellen als cellulair vaccin tegen RA te testen in de daarvoor beschreven model.

De belangrijkste uitleesparameters in de adoptieve transfer experimenten zijn:

1. De klinische scores van de verschillende ziektemodellen. Na adoptieve transfer van relevante T en/of B lymfocyt subsets zal het verloop van de ziekte worden bestudeerd om de *in vivo* functie van deze specifieke cellen in auto-immuunziekten te achterhalen.
2. Dit model is ook geschikt om de effecten van de specifieke cellen gebruikt voor transfer op andere B en/of T lymfocyt subsets en hun functies te bestuderen.

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

Het CIA model:

Er is een protocol voor de efficiënte inductie van CIA in C57BL/6 muizen (Bevaart L. et al., *Methods Mol Biol.*, 2010; 602;181-92), dat veelvuldig binnen onze afdeling gebruikt wordt.

In het kort:

C57BL/6 muizen worden twee maal geïmmuniseerd (100 µl per keer) met kippen collageen type II en Complete Freund's Adjuvant (CFA) (initiatie + booster), aangezien C57BL/6 muizen minder vatbaar zijn voor CIA ten opzichte van DBA/1 muizen. De tweede immunisatie vindt plaats 21 dagen na de eerste immunisatie. De immunisaties worden intradermaal uitgevoerd bij de staartbasis van de muis. Hiervoor moet de staartbasis eerst geschoren worden. De immunisaties vinden plaats onder anesthesie met isofluraan. Het wegen van de muizen en het bijhouden van artritis scores begint 18 dagen na de eerste immunisatie.

De dieren worden op zijn laatst 100 dagen na de eerste immunisatie gedood.

Het CAIA model:

De inductie van CAIA is uitgebreid beschreven in het protocol dat de fabrikant meeleverd met de anti-collageen type II cocktail. We gebruiken dit geoptimaliseerde en gevalideerde protocol in onze experimenten.

In het kort: op dag 0 worden muizen geïnjecteerd met de antilichaam cocktail en 3-5 dagen na deze immunisatie ontvangen de muizen een lage concentratie lipopolysaccharide (LPS) om de ziekte te synchroniseren tussen de muizen. Dit verergert het ziektebeeld niet. Artritis ontwikkelt vanaf dag 4 en de muizen worden 2 weken na ziekte inductie gevolgd. De piek van de ziekte ontstaat rond dag 8 na immunisatie, daarna neemt de ontsteking (zwellen van de poten) weer af.

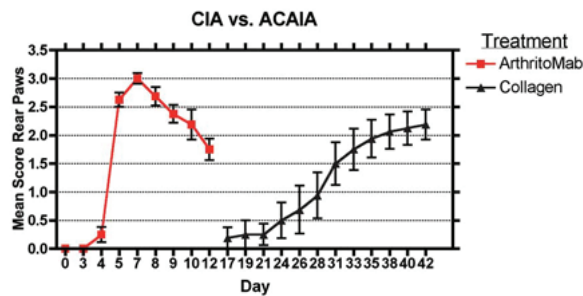
In beide modellen:

Tijdens de studie kan op meerdere tijdstippen bloed afgenomen worden (max volume 10 ml/kg eens per 2 weken (Diehl et al. *J. Appl. Toxicol* 2001) om de vorming van anti-collageen antilichamen te onderzoeken in het CIA model, of o.a. cytokines en acute fase eiwitten te kunnen meten in beide modellen.

Voor het scoren wordt een gestandaardiseerd protocol gebruikt met een score van 0-4 per poot en een maximum van 16 per muis (4 poten met een maximale score). Score: 0 – gezond; 1 – milde zwelling (1 vinger/teen of gewricht); 2 – 2 of meer vingers/tenen of gewrichten; 3 – een totaal gezwollen poot; 4 – deformatie van de gehele poot.

In het CIA model wordt 2-3 keer per week gescoord vanaf 18 dagen na de eerste immunisatie. In het CAIA model worden de dieren dagelijks gescoord.





(<http://www.arthritomab.com>)

**Figuur 1:** Ziekteverloop van het CAIA model, geïnduceerd met ArthritoMab (rood), vergeleken met het CIA model, geïnduceerd met behulp van collageen (zwart). De zwelling van de poten neemt veel sneller tot uitdrukking in het CAIA model dan in het CIA model, en neemt ook weer snel af. Als gevolg zijn de dieren veel korter in het experiment.

Behandeling met antilichamen of small molecule inhibitors:

Voor subdoelen 2 en 3 uit het projectvoorstel worden muizen behandeld met stoffen die de APRIL pathway of Fc-receptor pathway activeren of blokkeren. Deze worden afhankelijk van de compound oraal, subcutaan, intraperitoneaal, of intraveneus toegediend met in acht neming van de richtlijnen beschreven in het Handboek Proefdierkunde (L.F.M. van Zutphen et al. 2012). Bij herhaaldelijke injecties wordt rekening gehouden met mogelijke inflammatie op de plaats van injectie, en indien mogelijk wordt een andere locatie genomen voor opeenvolgende injecties. Ook zal het gebruik van osmotische pompjes in overweging worden genomen wanneer frequent en voor langere tijd geïnjecteerd gaat worden.

Adoptive transfer experimenten:

Afhankelijk van de specifieke onderzoeksvraag van het experiment, zullen B en/of T lymfocyt populaties worden verkregen van relevante (transgene of knock out) muizen. Deze cellen zullen vervolgens systemisch (subcutaan, in de peritoneale ruimte of intraveneus via de staartvene (Roth et al. *Journal of Experimental Biology*, 1997)) worden ingespoten in ontvanger muizen. Cel aantallen die ingespoten worden zijn afhankelijk van de B en/of T lymfocyt populaties die gebruikt worden.

De transfer van cellen vindt plaats naar ontvanger muizen voor aanvang van artritis (proylactische setting) en/of de dieren al artritis hebben ontwikkeld (therapeutische setting). Met de laatstgenoemde set experimenten kan worden onderzocht of bepaalde subsets van B en/of T lymfocyten gebruikt kunnen worden als cellulair vaccin tegen auto-immuunziektes. Inductie van CIA en CAIA vindt plaats zoals hierboven beschreven voor beide modellen.

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

Idem bijlage 5: Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn bekend uit voorgaande studies. Op basis van deze gegevens kan een groepsgrootte worden berekend, waarbij het significantieniveau  $\alpha$  steeds op 0.05 zal worden gesteld en gebruik zal worden gemaakt

van een Student's t-test, een Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA, afhankelijk van de experimentele proefopzet, om deze groepsgrootte te bepalen.

Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de gekozen interventie en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

Voorbeeld van de standaard uitgevoerde analyse binnen onze groep:

We berekenen de groepsgrootte met behulp van het programma power and precision Pro (<http://www.power-analysis.com/>). We gebruiken de tweezijdige T test voor onafhankelijke samples, met een power van 80% en een P waarde van 0.05:

Type studie: T-test

Gewenste output: Groepsgrootte

Ontwerp: Onafhankelijk  
Alfa=0,05 power=0,8 DIFF=6 SIGMA=5 M=1  
Groepsgrootte: 12

We kijken in ons onderzoek naar een continue uitkomstparameter van onafhankelijke controle en experimentele dieren, met 1 controle dier per experimenteel dier. In vorige onderzoeken waren de uitkomstparameters normaal verdeeld met een standaarddeviatie van 5. Wanneer het werkelijke verschil tussen de gemiddeldes van de controle en experimentele groepen 6 is, zullen we zowel 12 dieren nodig hebben in de experimentele groep en in de controlegroep om de nul hypothese, dat de populatiegemiddeldes van de experimentele en controle groepen gelijk zijn, met een kans (power) van 0,8 te kunnen verwerpen. De fout van de eerste orde (alfa) die in deze toetsing van de nul hypothese wordt geaccepteerd is 0,05.

## B. De dieren

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

Voor de studies worden muizen gebruikt. Muizen zijn goed gekarakteriseerd voor de verschillende uitleesparameters. Muizen zijn gekenmerkt door een goede inductie van beide arthritis modellen. Er wordt gewerkt met wild type muizen dan wel met specifieke transgene dieren (overexpressie/deficiënte Bob1; APRIL transgene dieren; B-cel deficiënte dieren; FcR deficiënte dieren dan wel humane FcR transgene dieren).

Herkomst van de muizen is aankoop bij een gerenommeerd fokbedrijf of via eigen fok.

Levensstadium: 6 weken tot maximaal 6 maanden oud. We gebruiken zowel mannen als vrouwen.

Geschatte aantallen per subdoel:

### **Subdoel 1: Bob1 en auto-immuniteit**

We hebben 12 dieren per groep nodig. Hiervoor maken we gebruik van onderstaand schema (tabel 1). Deze experimenten worden alleen uitgevoerd indien de Bob1 overexpressie muizen in het spontane ziektemodel (bijlage 3) binnen de eerste drie maanden van tamoxifen toediening geen zichtbaar ongerief of gewichtsverlies ontwikkelen.

Tabel 1.

|                       | <b>Immunisatie</b>                             | <b>Follow up</b> | <b>n</b> |
|-----------------------|--|------------------|----------|
| <b>Controle CIA</b>   | Collageen type II/CFA                          | Max. 100 dagen   | 12       |
| <b>Transgeen CIA</b>  | Collageen type II/CFA                          | Max. 100 dagen   | 12       |
| <b>Controle CAIA</b>  | collageen type II<br>antilichaam cocktail/ LPS | Max. 100 dagen   | 12       |
| <b>Transgeen CAIA</b> | collageen type II<br>antilichaam cocktail/ LPS | Max. 100 dagen   | 12       |

We hebben 2 modellen (CIA en CAIA), 4 transgene Cre-muislijnen en 4 controle groepen. Dit komt neer op  $2 * 12 * 8 = 192$  benodigde muizen.

### **Subdoel 2: APRIL en auto-immuniteit**

We hebben 12 dieren per groep nodig. Het eerste experiment zal plaatsvinden met 12 APRIL-transgene muizen en 12 controle dieren (zie tabel 1). Dit komt neer op  $12 * 2 = 24$  dieren per arthritis model. In totaal dus  $2 * 24 = 48$  dieren.

In het volgende experiment bekijken we de effecten van een behandeling met biologicals of small molecule inhibitors (compounds) die aangrijpen op de APRIL pathway in zowel een profylactische setting (voor aanvang van de ziekte) als therapeutische setting (als de ziekte zich gemanifesteerd heeft). Aangezien we veronderstellen dat de antilichaam productie door B lymfocyten een belangrijke bijdrage levert aan het ziektebeeld en dat de compounds hier een effect op hebben, voeren we dit type experiment alleen uit in het CIA model. Hiervoor maken we gebruik van onderstaand schema (zie tabel 2):

Tabel 2.

|                               | Inductie CIA  | N  |
|-------------------------------|---------------|----|
| <b>A controle</b>             | profylactisch | 12 |
| <b>B behandeling compound</b> | profylactisch | 12 |
| <b>C controle</b>             | therapeutisch | 12 |
| <b>D behandeling compound</b> | therapeutisch | 12 |

Per compound zijn in het profylactische model  $2 \times 12 = 24$  muizen nodig. In het therapeutische model moeten alle dieren ziekteverschijnselen vertonen om deel te kunnen nemen aan het experiment. Voor CIA verwachten we dat ongeveer 80% van de muizen ook daadwerkelijk ziek wordt, hiervoor moeten we dus compenseren in het therapeutische model. Dit komt neer op:  $24 + 5$  (20% van 24) = 29 muizen. Gecombineerd met het profylactische model zijn dit  $24 + 29 = 53$  muizen.

We verwachten maximaal 3 verschillende compounds (antilichamen of small molecule inhibitors die interfereren met de APRIL pathway) te testen en hebben dus  $3 \times 53 = 159$  dieren nodig voor dit experiment.

#### Adoptieve transfer experimenten:

Uit eerdere studies is gebleken dat de meeste vragen beantwoord kunnen worden als 12 muizen per groep worden gebruikt. In het eerste experiment willen we aantonen dat de IL-10 specifiek geproduceerd door de APRIL-geïnduceerde B cellen belangrijk is voor de bescherming tegen CIA en CAIA. Om dit aan te tonen plannen we een experiment met de volgende groepen en dieraantallen (zie tabel 3):

Tabel 3.

|   | Genotype ontvanger muis                          | Genotype donor muis               | N  |
|---|--|-----------------------------------|----|
| A | [APRIL <sup>WT/WT</sup> x B-cel <sup>-/-</sup> ] | IL-10 <sup>-/-</sup> B lymfocyten | 12 |
| B | [APRIL <sup>WT/WT</sup> x B-cel <sup>-/-</sup> ] | WT B lymfocyten                   | 12 |
| C | -[APRIL <sup>+/WT</sup> x B-cel <sup>-/-</sup> ] | IL-10 <sup>-/-</sup> B lymfocyten | 12 |
| D | -[APRIL <sup>+/WT</sup> x B-cel <sup>-/-</sup> ] | WT B lymfocyten                   | 12 |

Dit experiment wordt gepland in modellen voor CIA en CAIA. Dit levert  $2 \times 4 \times 12 = 96$  dieren. Voor het aantal donormuizen gaan we uit van de volgende berekening: gemiddeld zullen we 40 miljoen B cellen uit een milt van 1 muis halen. De B cel deficiënte muizen zullen 10 miljoen B lymfocyten ontvangen. Met 1 milt kunnen dus 4 muizen behandeld worden. Er zijn 24 donormuizen per genotype nodig.  $24/4 = 6 + 2$  extra (ter compensatie van mogelijk verlies van B cellen door het isoleren en opwerken) = 8 donormuizen/genotype. We hebben 2 genotypen voor de donormuizen, dus komen we op een totaal van  $8 \times 2 = 16$  muizen. Met 2 ziektemodellen zullen dit dus  $16 \times 2 = 32$  donor muizen zijn.

Voor dit type experiment hebben we maximaal  $96 + 32 = 128$  muizen nodig.

In het volgende experiment willen we aantonen dat de transfer van APRIL-geïnduceerde regulatoire B cellen werkt als celtherapie voor CIA. CAIA experimenten zijn hiervoor niet nodig, omdat het CIA model voldoende informatie zal geven over de mogelijke beschermende functie van APRIL-geïnduceerde regulatoire B cellen. Hiervoor maken we gebruik van een proefopzet met de volgende groepen en dieraantallen:

|          | Genotype ontvanger muis | Genotype donor muis                           | Model         | N  |
|----------|-------------------------|---|---------------|----|
| <b>A</b> | WT                      | WT regulatoire B-cellen                       | profylactisch | 12 |
| <b>B</b> | WT                      | APRIL <sup>+/WT</sup> tg regulatoire B-cellen | profylactisch | 12 |
| <b>C</b> | WT                      | WT regulatoire B-cellen                       | therapeutisch | 12 |
| <b>D</b> | WT                      | APRIL <sup>+/WT</sup> tg regulatoire B-cellen | therapeutisch | 12 |

Alle ontvangermuizen in het therapeutische model moeten ziekteverschijnselen vertonen om deel te kunnen nemen aan het experiment. Voor CIA verwachten we dat ongeveer 80% van de muizen ook daadwerkelijk ziek wordt, hiervoor moeten we dus compenseren in het therapeutische model. Dit komt neer op:  $24 + 24 + 5$  (20% van 24) = 53 muizen. In totaal hebben we dus 53 ontvangermuizen nodig.

Voor het aantal donormuizen gaan we uit van de volgende berekening: gemiddeld zullen we 3 miljoen B cellen uit het peritoneum van 1 muis halen. We willen 1 miljoen B cellen inspuiten in de ontvanger muis, dus  $3/1 = 3$  muizen kunnen behandeld worden met B lymfocyten uit 1 donormuis.  $24 \text{ muizen} / 3 = 8, + 2$  extra

(ter compensatie van mogelijk verlies van B cellen door het isoleren en opwerken) donormuizen per genotype nodig. We hebben 2 verschillende genotypen dus zijn er  $2 \times 10 = 20$  donormuizen nodig.

Voor dit type experiment hebben we maximaal  $53 + 20 = 73$  muizen nodig.

Het totaal aantal muizen voor adoptieve transfer experimenten in het CIA en/of CAIA model wordt geschat op maximaal **201** muizen.

**In totaal zijn voor subdoel 2:  $48 + 159 + 201 = 408$  muizen nodig.**

### **Subdoel 3: Fc receptoren en auto-immuniteit**

Om de rol van humane Fc receptor activatie op de ontwikkeling van CIA of CAIA te testen schatten we dat we 4 verschillende humane Fc receptor transgene muizen gaan gebruiken in een proefopzet zoals beschreven in tabel 1. Dit komt neer op  $4 \times 12 \times 2 = 96$  dieren per model.

Vervolgens zullen we de effecten van een behandeling met antilichamen of small molecule inhibitors (compounds) die aangrijpen op activatie van de Fc receptor testen in zowel een profylactische setting (voor aanvang van de ziekte) als therapeutische setting (als de ziekte zich gemanifesteerd heeft). Hiervoor maken we gebruik van het schema in tabel 2. Per compound zijn in het profylactische model  $2 \times 12 = 24$  muizen nodig. In het therapeutische model moeten alle dieren ziekteverschijnselen vertonen om deel te kunnen nemen aan het experiment. Voor CIA en CAIA verwachten we dat ongeveer 80% van de muizen ook daadwerkelijk ziek wordt, hiervoor moeten we dus compenseren in het therapeutische model. Dit komt neer op:  $24 + 5$  (20% van 24) = 29 muizen. Gecombineerd met het profylactische model zijn dit  $24 + 29 = 53$  muizen.

We schatten 3 verschillende compounds (biologicals of small molecule inhibitors die interfereert met de Fc receptor signaling) te testen en hebben dus  $3 \times 53 = 159$  dieren per model nodig.

In totaal zullen voor subdoel 3:  $96 + 159 = 255$  muizen nodig zijn per arthritis model.

**In totaal dus  $2 \times 255 = 510$  dieren voor subdoel 3.**

**Het totaal aantal muizen dat wij nodig hebben voor deze bijlage is  $192 + 408 + 510 = 1110$  muizen.**

### **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

| |

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

Nee

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

| |

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

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

Vervanging van deze experimenten is niet mogelijk. Er zijn geen *ex vivo* systemen beschikbaar die de complexe interacties van het immuun systeem tijdens de ontwikkeling van auto-immuniteit goed nabootsten.

Vermindering van proefdieren wordt bewerkstelligd met dit protocol door meerdere uitkomstparameters te analyseren in één dier. Zo wordt voorkomen dat meerdere studieprotocollen nodig zijn. Gebruik van het weefsel na afloop van de experimenten is zoveel mogelijk geoptimaliseerd, zodat histologie, flow cytometrie, het meten van materiaal (bv cytokines) in serum en isolatie van RNA voor gen expressie analyse (uit verschillende organen) van hetzelfde dier mogelijk is. Vermindering vindt ook plaats door bepaalde

experimenten (zoals bijvoorbeeld de transfer van APRIL-geïnduceerde regulatoire B cellen als celtherapie in subdoel 2) in 1 arthritis model te testen in plaats van in beide. Daarnaast vindt er vermindering van het aantal dieren plaats door de therapeutische experimenten waarin compounds getest worden (subdoel 2 en 3) alleen plaats te laten vinden als de data uit de profylactische experimenten met de compounds verschillen in ziekte laten zien.

Idem bijlage 5: Vermindering vindt ook plaats door experimenten te starten met 6 dieren per groep, ondanks dat de groepsgrootte statistisch is bepaald op 12. Mocht er geen verschil tussen de controle groep en de experimentele groep optreden bij gebruik van 6 muizen per groep, dan wordt het experiment niet voortgezet met de overige 6 muizen.

Verfijning wordt bewerkstelligd door de vraagstelling correct te formuleren en alleen het juiste ziektemodel te gebruiken, die de vraagstelling kan beantwoorden. Zodra ziekte ontwikkelt, wordt gel voor vocht en geweekt voer met dezelfde consistentie als het normale voer aangeboden op de bodem van de kooi. Voor de behandeling met compounds in subdoel 2 en 3 zal bij langdurige perioden met herhaaldelijke injecties overwogen worden een osmotisch pompje te gebruiken om herhaaldelijk injecteren over een langere periode te voorkomen.

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.

1/ Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden en geweekt voer wordt toegevoegd tijdens de piek van de ziekte. In het CAIA model ontwikkelt het ziektebeeld echter erg snel, waardoor de dieren dagelijks gecontroleerd, gewogen en gescoord moeten worden van dag 4 t/m dag 18.

2/ Idem bijlage 5: De dieren worden in een gesloten D1 of, indien nodig vanwege gebruik van compounds, in een DMII omgeving gehuisvest. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het MLI of MLII-lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

[ ]

## 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.

Anesthesie wordt gebruikt bij de inductie van het CIA model, voor het CAIA model is dit niet nodig. Anesthesie is niet nodig voor de adoptieve transfer van cellen in ontvanger muizen (subdoel 2). Pijnstilling tijdens de ziekte inductie wordt niet gebruikt aangezien dit onverenigbaar is met de proefopzet. De meeste pijnstilling werkt ontstekingsremmend en zal dus ook de artritis remmen. We kiezen ervoor om geen opiaten als pijnstilling te geven, omdat wij de bijwerkingen van het gebruik van opiaten (obstipatie, misselijkheid en sufheid) niet vinden opwegen tegen de pijn die de dieren ervaren vanwege de artritis. Daarnaast kan het langdurig gebruik van opiaten tijdens de experimenten leiden tot veel gewichtsverlies bij de dieren.

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

[ ]

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1/ Er kunnen mogelijk wondjes ontwikkelen op de plaats van injectie.
- 2/ Artritis inductie (zwellings/ontsteking van de poten)
- 3/ Bloedafname tijdens het experiment.
- 4/ Euthanasie
- 5/ Behandeling met compounds bij een deel van de dieren

We verwachten geen aantasting van het welzijn van de dieren door de transfer van B en/of T lymfocyten (subdoel 2).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Af en toe kunnen wondjes ontstaan bij de staartbasis als gevolg van de immunisaties. Meestal zullen de wonden drogen en korstjes zijn binnen een week gevormd. In sommige gevallen komen de wondjes pas later tevoorschijn; wondjes kunnen een week na immunisatie verschijnen zelfs als er eerst geen wondjes zichtbaar waren. Indien de wondjes niet zichtbaar binnen een week genezen, dan wordt het dier vroegtijdig opgeofferd.

Nr 2-4 van de beschreven vormen van welzijnsaantasting zijn onlosmakelijk verbonden met het beschreven dierexperiment en kunnen dus niet voorkomen worden.

Voor de behandeling met compounds zal bij langdurige perioden met herhaaldelijke injecties overwogen worden een osmotisch pompje te gebruiken.

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

Wanneer wondjes ontstaan, wordt dit op het artritis score formulier genoteerd. Wanneer de wondjes niet binnen een week zichtbaar genezen, wordt het dier uit de proef gehaald. Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden en geweekt voer en gel voor vocht wordt aangeboden tijdens de piek van de ziekte.

## 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.

In het CIA model worden de dieren vanaf dag 18 na de eerst immunisatie 2-3 keer per week gescoord voor artritis en gewichtsverlies.

In het CAIA model worden de dieren dagelijks (dag 4 t/m 18) gescoord voor artritis en gewichtsverlies.

Gewichtsverlies wordt gebruikt als humaan eindpunt. Een verlies van 15% ten opzichte van het hoogste gemeten gewicht, of twee maal achtereenvolgend 10% gewichtsverlies worden gebruikt als humane eindpunten. Ook bij een artritis score van 12 of hoger, bij 3 volledig, gezwollen of ontstoken poten of wanneer de huid van één of meerdere poten kapot gaat, wordt de muis opgeofferd.

Wanneer wondjes die mogelijk ontstaan als gevolg van de immunisatie niet binnen een week zichtbaar genezen, wordt het dier ook uit de proef gehaald.

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

Gebaseerd op voorgaande experimenten verwachten we dat minder dan 10% van de dieren de humane eindpunten behaalt.

## K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief voor de muizen waarin artritis wordt geïnduceerd is geclassificeerd als ernstig. Naar verwachting zal een deel van de muizen een minder ernstige vorm van artritis ontwikkelen door de therapeutische interventie van bijvoorbeeld Fc receptor signalering of APRIL. Ondanks dat we verwachten dat deze dieren minder ziek zullen worden dan de controle dieren, wordt het ongerief binnen het huidige classificatiesysteem ingeschaald als ernstig. Tevens zullen de dieren niet gedurende de hele looptijd van de CIA experimenten klinische symptomen vertonen, aangezien de ziekte tijd nodig heeft om te ontwikkelen na immunisatie met collageen en CFA. Verder zijn onze humane eindpunten dusdanig geformuleerd dat de muizen waarin ernstige artritis is ontstaan eerder uit het experiment worden gehaald.

Het ongerief voor de dieren waaruit de B en/of T lymfocyt populaties worden geïsoleerd voor de adoptieve transfers beschreven in subdoel 2 wordt geclassificeerd als terminaal.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Pathologische/histologische analyse wordt uitgevoerd op de weefsels, met name de achterpoten en delen van het immuunsysteem (lymfeklieren en milt)

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

9

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 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="Experimentele autoimmuun encephalomyelitis (EAE)"/> |

*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.

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) is een model voor neuroinflammatie, waar wij binnen de onderzoeksgroep veel ervaring mee hebben (Hoek et al., 2000; Bettelli and Baeten, J Clin Invest 2006). De ziekteverschijnselen die de dieren vertonen, lijken op de klinische symptomen van multiple sclerose. Het EAE model wordt daarom gebruikt als model voor MS.

Met het EAE model kunnen we expliciet de overige (niet antilichaam producerende) functies van B lymfocyten, zoals antigeen presentatie aan T lymfocyten, bestuderen in de context van auto-immuniteit.

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.

EAE zal worden opgewekt door immunisatie met myeline, in het kort: Immunisatie met myeline (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein - MOG) eiwit of peptide (max 10ml/kg per keer, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001). Muizen worden geïmmuniseerd met MOG eiwit (B en T lymfocyt activatie) of peptide (voornamelijk T lymfocyt activatie) in Complete Freund's Adjuvant (CFA) om een immuun respons op te wekken. Tevens wordt pertussis toxine gebruikt om de bloed-hersen barrière te kunnen doorbreken (max 10ml/kg, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001).

Zodra de dieren symptomen van EAE ontwikkelen, worden de dieren dagelijks gescoord op gewicht en ziekte. EAE wordt gescoord als volgt: 0 – normaal, gezond; 1 – slappe staart; 2 – zwakte in de achterpoten of abnormaal lopen; 3 – totale verlamming in de achterpoten; 4 – verlamming van de achterpoten en gedeeltelijke verlamming van de voorpoten; 5 – overlijden. Om ethische redenen worden muizen die een score van 4 behalen meteen geëuthanaseerd, en krijgen voor de rest van het experiment score 5



toebedeeld omdat het een progressief ziektebeeld betreft. Deze dieren zouden score 5 behaald hebben wanneer ze niet geëuthanaseerd zouden zijn.

Indien nodig, kan er bloed worden afgenomen tijdens het experiment (max volume 8ml/kg eens per 2 weken, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001).

Voor subdoelen 2 en 3 worden muizen behandeld met compounds die de APRIL pathway of Fc-receptor pathway activeren of blokkeren. Deze worden afhankelijk van de compound oraal, subcutaan, intraperitoneaal, of intraveneus toegediend met in acht neming van de richtlijnen beschreven in het Handboek Proefdierkunde (L.F.M. van Zutphen et al. 2012). Bij herhaaldelijke injecties wordt rekening gehouden met mogelijke inflammatie op de plaats van injectie, en indien mogelijk wordt een andere locatie genomen voor opeenvolgende injecties.

Adoptive transfer experimenten:

Afhankelijk van de specifieke onderzoeksvraag van het experiment, zullen B en/of T lymfocyt populaties worden verkregen van relevante (transgene of knock out) muizen. Deze cellen zullen vervolgens systemisch (subcutaan, in de peritoneale ruimte of intraveneus via de staartvene (Roth et al. *Journal of Experimental Biology*, 1997)) worden ingespoten in ontvanger muizen. Cel aantallen die ingespoten worden zijn afhankelijk van de B en/of T lymfocyt populaties die gebruikt worden.

De transfer van cellen vindt plaats naar ontvanger muizen alvorens EAE te induceren om de effectiviteit van de cellen in profylactische setting te bestuderen, en in dieren die al ziekte (EAE model) hebben ontwikkeld. Met de laatstgenoemde set experimenten kan worden onderzocht of bepaalde subsets van B en/of T lymfocyten gebruikt kunnen worden als cellulair vaccin tegen auto-immuunziektes. Inductie van EAE vindt plaats zoals hierboven beschreven.

De dieren worden aan het einde van het experiment geëuthanaseerd.

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

[Idem bijlage 4. We verwachten dat 100% van de muizen ziekteverschijnselen vertoont na inductie van EAE.: Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn bekend uit voorgaande studies. Op basis van deze gegevens kan een groepsgrootte worden berekend, waarbij het significantieniveau alpha steeds op 0.05 zal worden gesteld en gebruik zal worden gemaakt van een Student's t-test, een Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA, afhankelijk van de experimentele proefopzet, om deze groepsgrootte te bepalen.

Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de gekozen interventie en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

Voorbeeld van de standaard uitgevoerde analyse binnen onze groep:

We berekenen de groepsgrootte met behulp van het programma power and precision Pro (<http://www.power-analysis.com/>). We gebruiken de twee zijdig T test voor onafhankelijke samples, met een power van 80% en een P waarde van 0.05:

Type studie: T-test

Gewenste output: Groepsgrootte

Ontwerp: Onafhankelijk

Alfa=0,05 power=0,8 DIFF=6 SIGMA=5 M=1

Groepsgrootte: 12

We kijken in ons onderzoek naar een continue uitkomstparameter van onafhankelijke controle en experimentele dieren, met 1 controle dier per experimenteel dier. In vorige onderzoeken waren de uitkomstparameters normaal verdeeld met een standaarddeviatie van 5. Wanneer het werkelijke verschil tussen de gemiddeldes van de controle en experimentele groepen 6 is, zullen we zowel 12 dieren nodig hebben in de experimentele groep en in de controlegroep om de nul hypothese, dat de populatiegemiddeldes van de experimentele en controle groepen gelijk zijn, met een kans (power) van 0,8 te kunnen verwerpen. De fout van de eerste orde (alfa) die in deze toetsing van de nul hypothese wordt geaccepteerd is 0,05.

## B. De dieren

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

Voor de studies worden muizen gebruikt. Muizen zijn goed gekarakteriseerd voor de verschillende uitleesparameters. Muizen zijn gekenmerkt door een goede inductie van dit MS model. Er wordt gewerkt met wild type muizen dan wel met specifieke transgene dieren (overexpressie/deficiënte Bob1; APRIL transgene dieren; B-lymfocyt deficiënte dieren; FcR deficiënte dieren dan wel humane FcR transgene dieren).

Herkomst van de muizen is aankoop bij een gerenommeerd fokbedrijf of via eigen fok.

Levensstadium: 6 weken tot maximaal 6 maanden oud. We gebruiken zowel mannen als vrouwen.

Geschatte aantallen per doel:

### **Subdoel 1: Bob1 en auto-immuniteit**

We hebben 12 dieren per groep nodig. Hiervoor maken we gebruik van onderstaand schema (tabel 1). Deze experimenten worden alleen uitgevoerd indien de Bob1 overexpressie muizen in het spontane ziektemodel (bijlage 3) binnen de eerste drie maanden van tamoxifen toediening geen zichtbaar ongerief of gewichtsverlies ontwikkelen.

Tabel 1.

|                  | <b>Immunisatie</b> | <b>Follow up</b> | <b>n</b> |
|------------------|--------------------|------------------|----------|
| <b>Controle</b>  | MOG/CFA            | Max. 100 dagen   | 12       |
| <b>Transgeen</b> | MOG/CFA            | Max. 100 dagen   | 12       |

We hebben 4 transgene Cre-muislijnen en 4 controle groepen. Dit komt neer op  $12 \times 8 = 96$  benodigde muizen.

### **Subdoel 2: APRIL en auto-immuniteit**

We hebben 12 dieren per groep nodig. Het eerste experiment vindt plaats met 12 APRIL-transgene muizen en 12 controle dieren (zie tabel 1). Dit komt neer op  $12 \times 2 = 24$  dieren.

In het volgende experiment bekijken we de effecten van een behandeling met biologicals of small molecule inhibitors (compounds) die aangrijpen op de APRIL pathway in zowel een profylactische setting (voor aanvang van de ziekte) als therapeutische setting (als de ziekte zich gemanifesteerd heeft). Hiervoor maken we gebruik van onderstaand schema (tabel 2):

Tabel 2.

|                               | <b>Inductie EAE</b> | <b>N</b> |
|-------------------------------|---------------------|----------|
| <b>A controle</b>             | profylactisch       | 12       |
| <b>B behandeling compound</b> | profylactisch       | 12       |
| <b>C controle</b>             | therapeutisch       | 12       |
| <b>D behandeling compound</b> | therapeutisch       | 12       |

Per compound zijn  $4 \times 12 = 48$  muizen nodig. We verwachten dat 100% van de muizen ziekteverschijnselen vertoont na inductie van EAE, er hoeft in het therapeutische model dus niet gecompenseerd te worden voor dieren die geen ziekte ontwikkelen. We schatten 3 verschillende compounds (biologicals of small molecule inhibitors die interfereert met de APRIL pathway) te testen en hebben dus  $3 \times 48 = 144$  dieren nodig voor dit experiment.

Geschatte aantallen voor de adoptieve transfer experimenten:

Uit eerdere studies is gebleken dat de meeste vragen beantwoord kunnen worden als 12 muizen per groep worden gebruikt. In het eerste experiment willen we aantonen dat de IL-10 specifiek geproduceerd door de APRIL-geïnduceerde B lymfocyten belangrijk is voor de bescherming tegen EAE. Om dit aan te tonen plannen we een experiment met de volgende groepen en dieraantallen (zie tabel 3):

Tabel 3:

|          | <b>Genotype ontvanger muis</b>        | <b>Genotype donor muis</b>        | <b>N</b> |
|----------|---------------------------------------|-----------------------------------|----------|
| <b>A</b> | B cel <sup>ko</sup> x APRIL WT        | IL-10 <sup>-/-</sup> B lymfocyten | 12       |
| <b>B</b> | B cel <sup>ko</sup> x APRIL WT        | WT B lymfocyten                   | 12       |
| <b>C</b> | B cel <sup>ko</sup> x APRIL transgeen | IL-10 <sup>-/-</sup> B lymfocyten | 12       |
| <b>D</b> | B cel <sup>ko</sup> x APRIL transgeen | WT B lymfocyten                   | 12       |

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
|  |  |  |  |
|--|--|--|--|

Dit levert  $4 \times 12 = 48$  dieren. Voor het aantal donormuizen gaan we uit van de volgende berekening: gemiddeld zullen we 40 miljoen B lymfocyten uit een milt van 1 muis halen. De B lymfocyt deficiënte muizen zullen 10 miljoen B lymfocyten ontvangen. Met 1 milt kunnen dus 4 muizen behandeld worden. Er zijn 24 ontvanger muizen per genotype nodig.  $24/4 = 6 + 2$  extra (ter compensatie van mogelijk verlies van B lymfocyten door het isoleren en opwerken) = 8 donormuizen/genotype. We hebben 2 genotypen voor de donor muizen, dus komen we op een totaal van  $8 \times 2 = 16$  muizen. Voor dit type experiment hebben we maximaal  $48 + 16 = 64$  muizen nodig.

In het volgende experiment willen we aantonen dat de transfer van APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten werkt als celtherapie EAE. Hiervoor maken we gebruik van een proefopzet met de volgende groepen en dieraantallen:

|          | Genotype ontvanger muis | Genotype donor muis           | Model         | N  |
|----------|-------------------------|-------------------------------|---------------|----|
| <b>A</b> | WT                      | WT regulatoire B cellen       | profylactisch | 12 |
| <b>B</b> | WT                      | APRIL tg regulatoire B cellen | profylactisch | 12 |
| <b>C</b> | WT                      | WT regulatoire B cellen       | therapeutisch | 12 |
| <b>D</b> | WT                      | APRIL tg regulatoire B cellen | therapeutisch | 12 |

Alle ontvanger muizen in het therapeutische model moeten ziekteverschijnselen vertonen om deel te kunnen nemen aan het experiment. We verwachten dat 100% van de muizen ziekteverschijnselen vertoont na inductie van EAE. Dit komt neer op  $24 + 24 = 48$  muizen.

Voor het aantal donormuizen gaan we uit van de volgende berekening: gemiddeld zullen we 3 miljoen B lymfocyten uit het peritoneum van 1 muis halen. We willen 1 miljoen B lymfocyten inspuiten in de ontvanger muis, dus  $3/1 = 3$  muizen kunnen behandeld worden met B lymfocyten uit 1 donormuis.  $24 \text{ muizen} / 3 = 8, + 2$  extra (ter compensatie van mogelijk verlies van B lymfocyten door het isoleren en opwerken) donormuizen per genotype nodig. We hebben 2 genotypen dus zijn er  $2 \times 10 = 20$  donormuizen per model nodig. Voor dit type experiment hebben we maximaal  $48 + 20 = 68$  muizen nodig.

Voor de adoptieve transfer experimenten hebben we maximaal  $64 + 68 = 132$  muizen nodig

**In totaal zijn voor subdoel 2:  $24 + 144 + 132 = 300$  muizen nodig.**

**Subdoel 3: Fc receptoren en auto-immuniteit**

Om de rol van Fc receptor activatie op de ontwikkeling van EAE te testen schatten we dat we 3 verschillende humane Fc receptor transgene muizen gaan gebruiken in een proefopzet zoals beschreven in tabel 1. Dit komt neer op  $4 \times 12 \times 2 = 96$  dieren.

Vervolgens zullen we de effecten van een behandeling met biologicals of small molecule inhibitors (compounds) die aangrijpen op activatie van de Fc receptor testen in zowel een profylactische setting (voor aanvang van de ziekte) als therapeutische setting (als de ziekte zich gemanifesteerd heeft). Hiervoor maken we gebruik van het schema in tabel 2. We schatten 3 verschillende compounds te testen en hebben dus  $3 \times 48 = 144$  dieren nodig voor experiment.

**In totaal zijn voor subdoel 3:  $96 + 144 = 240$  muizen nodig.**

**Het totaal aantal muizen dat wij nodig hebben voor deze bijlage zal  $96 + 300 + 240 = 636$  muizen zijn.**

**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.

Idem als in bijlage 4:

Vervanging van deze experimenten is niet mogelijk. Er zijn geen *ex vivo* systemen beschikbaar die de complexe interacties van het immuun systeem tijdens de ontwikkeling van auto-immuniteit goed nabootsten.

Vermindering van proefdieren wordt bewerkstelligd met dit protocol door meerdere uitkomstparameters te analyseren in één dier. Zo wordt voorkomen dat meerdere studieprotocollen nodig zijn. Gebruik van het weefsel na afloop van de experimenten is zoveel mogelijk geoptimaliseerd, zodat histologie, flow cytometrie, het meten van materiaal (bv cytokines) in serum en isolatie van RNA voor gen expressie analyse (uit verschillende organen) van hetzelfde dier mogelijk is. Vermindering vindt ook plaats door experimenten te starten met 6 dieren per groep, ondanks dat de groepsgrootte statistisch is bepaald op 12. Mocht er geen verschil tussen de controle groep en de experimentele groep optreden bij gebruik van 6 muizen per groep, dan wordt het experiment niet voortgezet met de overige 6 muizen.

Verfijning wordt bewerkstelligd door de vraagstelling correct te formuleren en alleen het juiste ziektemodel te gebruiken, die de vraagstelling kan beantwoorden. Zodra ziekte ontwikkelt, wordt gel voor vocht en geweekt voer met dezelfde consistentie als het normale voer aangeboden op de bodem van de kooi. Voor de behandeling met compounds in subdoel 2 en 3 zal bij langdurige perioden met herhaaldelijke injecties overwogen worden een osmotisch pompje te gebruiken om herhaaldelijk injecteren over een langere periode te voorkomen.

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.

1/ Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden en geweekt voer wordt toegevoegd tijdens de piek van de ziekte.

2/ Idem bijlage 1 en 4: De dieren worden in een gesloten D1 of, indien nodig vanwege gebruik van compounds, in een DMII omgeving gehuisvest. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het MLI of MLII-lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

N.v.t.

### **Huisvesting en verzorging**

#### **F. Huisvesting en verzorging**

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

Nee

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

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

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## 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.

Anesthesie is niet nodig voor de inductie van dit model. Anesthesie is ook niet nodig voor de adoptieve transfer van lymfocyten in ontvanger muizen (subdoel 2).

Pijnstilling tijdens de ziekte wordt niet gebruikt aangezien dit onverenigbaar is met de proefopzet (zie bijlage 4). De meeste pijnstilling werkt ontstekingsremmend en zal dus ook de EAE-geassocieerde ontsteking remmen. We kiezen ervoor om geen opiaten als pijnstilling te geven, omdat wij de bijwerkingen van het gebruik van opiaten (obstipatie, misselijkheid en sufheid) niet vinden opwegen tegen de pijn die de dieren ervaren vanwege de EAE. Daarnaast kan het langdurig gebruik van opiaten tijdens de experimenten leiden tot veel gewichtsverlies bij de dieren.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1/ Er kunnen wondjes ontwikkelen op de plaats van injectie.
- 2/ Multiple sclerosis inductie (verlamningsverschijnselen)
- 3/ Bloedafname tijdens het experiment.
- 4/ Euthanasie
- 5/ Behandeling met compounds bij een deel van de dieren

We verwachten geen aantasting van het welzijn van de dieren door de transfer van B en/of T lymfocyten (subdoel 2).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Mogelijk kunnen wondjes ontstaan bij de staartbasis als gevolg van de immunisaties. Meestal zullen de wondjes drogen en korsten zullen binnen een week gevormd worden. In sommige gevallen komen de wondjes pas later tevoorschijn; wondjes kunnen een week na immunisatie verschijnen zelfs als er eerst geen wondjes zichtbaar waren. Indien de wondjes niet zichtbaar binnen een week na ontstaan zijn genezen, dan wordt het dier vroegtijdig opgeofferd.

Nr 2-4 van de beschreven vormen van welzijnsaantasting zijn onlosmakelijk verbonden met het beschreven dierexperiment en kunnen dus niet voorkomen worden.

Voor de behandeling met compounds zal bij langdurige perioden met herhaaldelijke injecties overwogen worden een osmotisch pompje te gebruiken.

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

Wanneer wondjes ontstaan, zal dit op het EAE score formulier genoteerd worden. Wanneer de wondjes niet

binnen een week na ontstaan zichtbaar genezen, wordt het dier uit de proef gehaald.

Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden en geweekt voer en gel voor vocht wordt aangeboden tijdens de piek van de ziekte.

## 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.

Tijdens het experiment worden de dieren vanaf de eerste ziekteverschijnselen dagelijks gecontroleerd en gescoord voor neurologische effecten en gewichtsverlies.

1. Gewichtsverlies wordt gebruikt als humaan eindpunt. Een verlies van 15% ten opzichte van het hoogste gemeten gewicht, of twee maal achtereenvolgend 10% gewichtsverlies worden gebruikt als humane eindpunten.
2. Bij een EAE score van 4 (dit houdt in: verlamming van de achterpoten en gedeeltelijke verlamming van de voorpoten) wordt de muis onmiddellijk geëuthanaseerd.
3. Als muizen meer dan 30 dagen EAE symptomen vertonen, worden ze geëuthanaseerd.
4. Wanneer wondjes, ontstaan als gevolg van immunisatie, niet binnen een week na ontstaan zichtbaar genezen, wordt het dier uit de proef gehaald.

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

Gebaseerd op vorige experimenten verwachten we dat minder dan 20% van de dieren deze criteria behaalt.

## K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief voor de muizen waarin EAE wordt geïnduceerd is geclassificeerd als ernstig. Naar verwachting zal een deel van de muizen een minder ernstige vorm van EAE ontwikkelen door de therapeutische interventie van bijvoorbeeld Fc receptor signalering of APRIL. Ondanks dat we verwachten dat deze dieren minder ziek zullen worden dan de controle dieren, wordt het ongerief binnen het huidige classificatiesysteem ingeschaald als ernstig. Daarnaast zijn onze humane eindpunten dusdanig geformuleerd dat de muizen waarin ernstige EAE is ontstaan of de muizen die langer dan 30 dagen EAE symptomen vertonen uit het experiment worden gehaald.

Het ongerief voor de dieren waaruit de B en/of T lymfocyt populaties worden geïsoleerd voor de adoptieve transfers beschreven in subdoel 2 wordt geclassificeerd als terminaal.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Pathologische/histologische analyse wordt uitgevoerd op de weefsels, met name de hersenen, ogen en ruggemerg en delen van het immuunsysteem (bepaalde lymfe klieren en milt)

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31  
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD118002017843

**Bijlagen**

2

Datum 27 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 27 januari 2017. Het gaat om uw project "De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerose". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002017843. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

### **Wacht met de uitvoering van uw project**

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

### **Factuur**

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

**Meer informatie**

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

**Datum:**

27 januari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD118002017843

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



**Datum:**  
27 januari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD118002017843

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800  
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 343362777  
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31  
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM  
IBAN: NL68RABO0136166741

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Principal Investigator/Onderzoeker  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Datum:**  
27 januari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD118002017843

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]  
Functie: Onderzoeker  
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 maart 2017  
Geplande einddatum: 28 februari 2022  
Titel project: De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis  
Titel niet-technische samenvatting: De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis  
Naam DEC: DEC AMC  
Postadres DEC: Meibergdreef 31  
E-mailadres DEC: dec-amc@amc.uva.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.827,-  
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:

Amsterdam

Datum:

27 januari 2017

**Datum:**

27 januari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD118002017843

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 20 februari 2017 13:50  
**Aan:** Info-zbo; [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: vraag om aanvulling bij AVD118002017843

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvullingen ontvangen. Uw aanvraag is besproken door de CCD en er is besloten uw aanvraag te vergunnen. Omdat de betaling van de leges nog niet ontvangen zijn kan de beschikking en vergunning nog niet opgestuurd worden. De behandeltijd van uw aanvraag is opgeschort totdat de leges ontvangen zijn,  
Vriendelijke groet Diane Kegler

**Centrale Commissie Dierproeven**

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

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

---

**Van:** Info-zbo

**Verzonden:** donderdag 9 februari 2017 10:20

**Aan:** [REDACTED]

**CC:** [REDACTED]

**Onderwerp:** vraag om aanvulling bij AVD118002017843

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Het betreft uw aanvraag 'De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerose', met aanvraagnummer AVD118002017843. Bij de behandeling van uw aanvraag hebben wij nog een vraag voor aanvullende informatie. In bijlage 3.4.4.3 schat u het ongerief van alle dieren in als matig (100 %) , maar u voegt daaraan toe dat u niet kunt uitsluiten dat een gedeelte van de dieren ernstig ongerief zal ondervinden. Kunt u een inschatting maken van de verdeling tussen matig en ernstig ongerief? Kunt u een aangepaste versie van deze bijlage dierproeven aan ons toesturen? De behandeltijd van uw aanvraag is opgeschort totdat het antwoord is ontvangen.

Uw aanvraag zal in de vergadering van 17 februari door de CCD behandeld worden, wij willen u vragen voor die tijd de aangepaste versie aan ons toe te sturen,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**

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

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

T: 0900 2800028



E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

# Format DEC-advies

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.*

## A. Algemene gegevens over de procedure

*Bij de punten 1 t/m 7 dienen altijd de gevraagde gegevens te worden ingevuld.*

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project **De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerose**
3. Titel van de NTS **De rol en het bijsturen van witte bloedcellen (B lymfocyten) die betrokken zijn bij auto-immuunziekten zoals reuma en multiple sclerose**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning**
  - ~~wijziging van vergunning met nummer~~
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC **DEC-AMC**
  - telefoonnummer contactpersoon 
  - e-mailadres contactpersoon 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken **10-11-2016**
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD
7. Afstemming IvD
 

**De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.**
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Gestelde vraag / vragen
  - Verstrekt(e) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager **n.v.t.**
  - Datum
  - Gestelde vraag/vragen

- Datum antwoord
- Verstrekt(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. 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
- Advies expert

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

>Ja

*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*

2. De aanvraag betreft > een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? > Ja

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

> Nee

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling (het bestuderen van B lymfocyten en (auto-)antilichamen en hun rol in auto-immuunziekten, zoals RA en MS) en kan getypeerd worden als een project met drie subdoelen die onderling geen relatie of tijdsafhankelijkheid hebben. De drie subdoelen zijn: I) De rol van Bob1 in de ontwikkeling van auto-immuniteit, en specifiek de effecten van verschillen in Bob1 expressie op B lymfocyt differentiatie en functies. II) De rol van APRIL-gemedieerde regulatoire B lymfocyten in auto-immuniteit en de identificatie van het onderliggende mechanisme in deze specifieke B lymfocyten, III) De remming van immunactivering van macrofagen en microglia door auto-antilichamen.

De drie subdoelen dragen ieder bij aan het bereiken van de hoofddoelstelling. De drie subdoelen zijn volledig en duidelijk uitgewerkt en elk subdoel levert een bijdrage aan het hoofddoel. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op het voorwerk en ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.

Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.
  - > Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
  - > De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van BOB1, APRIL en Fc signalering in het functioneren van T en B cellen in de immuunrespons, maar dit wordt voornamelijk onderzocht in ziektemodellen voor reuma en MS, wat het onderzoek ook translationeel maakt.

## Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).
  - > Het directe doel van het project is het verkrijgen van nieuwe inzichten in de rol die B lymfocyten en (auto-)antilichamen kunnen spelen in auto-immuunziekten, zoals RA en MS. Het uiteindelijke doel is het bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapieën (in de toekomst) voor reuma en multiple sclerose.  
Het betreft hier zowel fundamenteel onderzoek als translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel, dat niet direct binnen de grenzen van dit project valt.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*).
  - > De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van meer inzicht in de rol die B lymfocyten en (auto-)antilichamen kunnen spelen in auto-immuunziekten (zoals reuma en MS), zijn de proefdieren, de onderzoekers en, op termijn, patiënten die lijden aan reuma of MS.  
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress en pijn ondervinden. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.  
Waarden die voor reuma of MS patiënten bevorderd worden: het ontwikkelen van therapieën voor deze ziekten.
6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.
  - > Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

## Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

> De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van deskundigheid en kennis.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de voorgestelde ziektemodellen voor reuma en MS. Hierdoor heeft de groep de expertise in huis om alle voorgestelde proeven te kunnen uitvoeren en is er voldoende kunde in huis om aan de-3V beginse- len te kunnen voldoen.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

> De opzet van het project en van alle experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen, is logisch en goed te begrijpen. Er zijn al preliminaire resultaten be- haald die aanwijzingen geven dat BOB1 een rol speelt in het reumamodel en APRIL in het reuma- en MS model. In post-mortem materiaal van patiënten werd aangetoond dat macrofagen in de hersenen geactiveerd kunnen worden door antilichamen. Deze resultaten ondersteunen de doelstellingen in de ziektemodellen. Er is hier sprake van een project met heldere onderzoeksopzet, die aansluit bij de gestelde doelen, De DEC verwacht dan ook dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

## Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, om- standigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoen- de wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voor- beelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)



> Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

> Er is voldaan aan bijlage III

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

> Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

> De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat sprake is van vermindering of ontneming van soortspecifieke eigenschappen. Echter de ziektemodellen induceren wel ernstige pijn (reumamodellen; opgezwollen gewrichten) of langdurig ongerief (verlamningsverschijnselen achterpoten in MS model) waardoor het natuurlijke gedrag van het dier belemmerd zal worden.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd, en de inschatting van het percentage dieren (<10% in reuma model en <20% in MS model) dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is per dierproef, op basis van ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> Het bestuderen van de complexe samenhang tussen B cellen, de auto-antilichamen en de verschillende celtypen in de reuma modellen en het MS model maakt het gebruik van proefdieren noodzakelijk. Vervanging van de dierproeven is hierdoor niet mogelijk, maar waar mogelijk maken de onderzoekers gebruik van ex vivo en in vitro experimenten om het aantal proefdieren te verminderen.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De aantallen dieren zijn ingeschat op basis van een power van 80% en een tweezijdige alpha van 0.05. De variatie en het te behalen verschil wordt, waar mogelijk, ingeschat op basis van eerdere experimenten. Hierdoor wordt een realistische schatting gemaakt voor het aantal dieren dat nodig is om een statistisch significant verschil te behalen.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> Voor een substantieel deel van de dieren (56% [in ziektemodellen] tot 70.5% [incl. spontane ziekteontwikkeling]) kan het ongerief oplopen tot ernstig door gewrichtsontstekingen (RA) en verlamningsverschijnselen (MS model). Er wordt geen pijnstilling toegepast in de ziektemodellen omdat dat interfereert met de te onderzoeken immuunrespons (ontstekingsremmende werking van de pijnstilling) of vanwege de bijwerkingen die opiaten (misselijkheid, obstipatie, sloomheid) veroorzaken. Dit is niet verenigbaar met de proef. De dieren krijgen geweekt voer en vocht in een gelvorm op de bodem van de kooi, indien nodig. Voor het langdurig toedienen van medicatie/stoffen/middelen om de immuunrespons bij te stellen zal een osmotisch pompje worden overwogen. De humane eindpunten zijn duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Onderbouw uw antwoord.

> n.v.t.

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

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

> Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen in gelijke mate worden ingezet.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De dieren worden in het kader van de proef gedood volgens een methode van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doden is noodzakelijk omdat in het kader van het experiment de weefsels uit het dier moeten worden gehaald voor analyse.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

> n.v.t.

## NTS

20. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

> Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid.

## D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

*Rechtvaardigt het verkrijgen van meer inzicht in de rol die B lymfocyten en (auto-)antilichamen kunnen spelen in auto-immuunziekten (zoals reuma en MS), het geringe tot ernstige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project dat gericht is op *het verkrijgen van meer inzicht in de rol die B lymfocyten en (auto-)antilichamen kunnen spelen in auto-immuunziekten (zoals reuma en MS)*, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan reuma en MS.

De 2899 proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat het pijn en stress veroorzaakt. De dieren zullen terminaal (22%), licht (7.5%), tot maximaal ernstig (70.5%) ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijke veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van patiënten. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op termijn een belangrijke bijdrage leveren aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor reuma en MS. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel een substantieel aantal muizen ernstig ongerief zullen ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd vanwege de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De gekozen ziektemodellen kunnen ernstig ongerief veroorzaken, maar de DEC erkent dat deze modellen de meest geschikte modellen zijn om deze vraagstelling in te beantwoorden. Het maatschappelijke belang van deze projectaanvraag is dat er meer inzicht komt in het ontstaan en het in stand houden van auto-immuunziekten. MS is een ziekte die vooral jongvolwassenen aandoet, met een zeer ernstig ziektebeeld. RA is een ernstige ziekte die

van grote invloed is op het dagelijks functioneren. Het verkrijgen van kennis over het onderliggende mechanisme van deze ziekten is noodzakelijk voor het ontwerp van nieuwe therapieën. De DEC is zich er van bewust dat het onderzoeken van de rol van B-lymfocyten een eerste stap kan zijn in de ontwikkeling van een nieuwe therapie, maar dat de uiteindelijke bijdrage van deze kennis aan een nieuwe therapie nog niet vaststaat. Deze onzekerheid is meegewogen in het advies. Het wetenschappelijke belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen.

De DEC waardeert de vermeerdering van fundamentele kennis en de toepassing daarvan in twee ziektemodellen op korte termijn als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het maximaal ernstige ongerief van 2045 dieren staat, alsmede het gebruik van 634 proefdieren met terminaal ongerief en het 220 dieren die door de fok met onbekende uitkomst mogelijk licht ongerief zullen ondergaan. Dat het onderzoek ook nog maatschappelijke gevolgen heeft doordat de inzichten verkregen uit dit onderzoek in de toekomst kunnen worden gebruikt voor het behandelen van reumatoïde artritis en MS weegt ook mee, zij het in mindere mate.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

### **De rol en moleculaire regulatie van B-lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerose**

De DEC is van mening dat het belang van het verkrijgen van nieuwe inzichten in de rol die B-lymfocyten en (auto-)antilichamen kunnen spelen in auto-immuunziekten, zoals RA en MS, en op langere termijn, de bijdrage aan therapeutische verbeteringen voor reuma en MS (het maatschappelijke belang), het terminale (n=634), geringe (n=220) tot ernstige (n=2045) ongerief dat de in totaal 2899 muizen als proefdieren in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd en zal de directe opbrengst zijn van dit onderzoek. Het maatschappelijke belang van de doelstelling is dat er meer inzicht komt in de onderliggende mechanismen van auto-immuunziekten zoals MS en RA, zodat er nieuwe therapieën ontwikkeld kunnen worden. De onzekerheid dat deze kennis daadwerkelijk bijdraagt tot een nieuwe therapie, is meegewogen in het advies. De DEC accepteert dat er nieuwe mechanismen onderzocht moeten worden om uiteindelijk een nieuwe therapie te kunnen ontwikkelen. Het exploreren van deze "ongebaande" weg is daardoor onzeker in het kader van therapie ontwikkeling, maar de uitkomst van deze proeven zal bijdragen aan meer inzicht in deze ziekteprocessen. Hierdoor kunnen ziekteprocessen beter begrepen worden wat uiteindelijk noodzakelijk is voor de behandeling ervan.

Om dit doel te bereiken worden muizen als proefdieren gebruikt. Het ernstige ongerief dat de dieren ondergaan, wordt veroorzaakt door het nabootsen van de ziekte. De vraagstelling kan het beste beantwoord worden in een model voor de betreffende auto-immuunziekten. Dit weegt mee in de afweging tussen het ernstig ongerief van de dieren ten opzichte van de belangen. De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen (veel ervaring met de modellen, duidelijk geformuleerde humane eindpunten met voldoende controle momenten, niet meer gehanteerd dan ui-

terst noodzakelijk, geweekt voer en gel voor vocht wordt aangeboden tijdens ziekteperiode).

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdierlijke alternatieven mogelijk zijn.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

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

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Dit DEC-advies is unaniem tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Tijdens het beoordelen van de aanvraag is uitgebreid stilgestaan bij de afweging of het ernstige ongerief bij een substantieel deel van de proefdieren in dit onderzoek gerechtvaardigd werd door het maatschappelijk belang. Het wetenschappelijk belang was evident. Over het maatschappelijk belang is uitvoerig gediscussieerd. De toepasbaarheid van de experimentele uitkomsten voor een nieuwe therapie zijn onzeker en daardoor zou uiteindelijk het maatschappelijke belang (het ontwikkelen van nieuwe therapieën) klein kunnen zijn. Echter, tijdens de vergadering werd duidelijk dat een bevinding toch een maatschappelijk belang kan hebben ondanks dat de toepassing ervan pas in de (verre) toekomst duidelijk kan worden. Daarnaast brengt het onderzoeken van een nieuwe theorie per definitie een onzekerheid met zich mee over de uiteindelijke toepasbaarheid maar is tegelijk ook noodzakelijk om een nieuwe therapie te kunnen ontwikkelen.

De DEC heeft laten meewegen dat:

- i) er uit het voorwerk grote aanwijzingen zijn om een rol te verwachten;
- ii) het om ernstige ziektes gaat die relatief vaak voorkomen;
- iii) het ernstige ongerief dat de dieren ondergaan, wordt veroorzaakt door het nabootsen van deze (ernstige) ziekten;
- iv) dat dit onderzoek niet verricht kan worden in een alternatief model zonder deze ziekte nabootsing (en het bijbehorende ongerief);
- v) de bevindingen direct kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuwe therapie;
- vi) of indirect kunnen bijdragen doordat er meer inzicht in het ziekteproces komt.

De DEC kwam daarom tot de conclusie dat naast het wetenschappelijke belang ook het maatschappelijk belang van dit onderzoek voldoende opweegt tegen het ernstige ongerief van deze proefdieren.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31  
1105 AZ AMSTERDAM



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD118002017843  
**Bijlagen**  
1

27 FEB 2017

Datum 24 februari 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 27 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis" met aanvraagnummer AVD118002017843. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 17 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft op ons verzoek de ongerief classificatie in bijlage 3.4.4.3 meer uitgewerkt. U heeft een herziene versie van bijlage 3.4.4.3 ingediend.

#### **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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Beoordeling achteraf**

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

De beoordeling achteraf is vereist vanwege de ongeriefclassificatie ernstig.

**Datum:**  
24 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD118002017843

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 27 januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Bezwaar**

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

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

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

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

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

**Meer informatie**

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



Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

[Redacted]

ir. G. de Peuter [Redacted]  
Algemeen Secretaris

**Datum:**  
24 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD118002017843

**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: Academisch Medisch Centrum

Adres: Meibergdreef 31

Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, voor het project "De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerose" met aanvraagnummer AVD118002017843, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] voor de uitvoering van het project is Onderzoeker verantwoordelijk. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 27 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 januari 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 januari 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 januari 2017, ontvangen op 27 januari 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 17 februari 2017

Aanvraagnummer:  
AVD118002017843

| Naam proef  | Diersoort/ Stam   | Aantal dieren | Ernst                       | Opmerkingen   |
|---|---|---------------|-----------------------------|---|
| <b>3.4.4.1 Fok met mogelijk ongerief</b>                        |   |               |                             |   |
|   | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / kruising B-cel deficiënte C57BL/6 X APRIL-transgene muizen   | 70            | 100% Licht                  |   |
| <b>3.4.4.2 Ex vivo experimenten</b>                             |   |               |                             |   |
|   | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Wild Type, overexpressie/deficiënte Bob1; APRIL transgene dieren; B-cel deficiënte dieren dan wel Fc receptor deficiënte dieren en humane Fc receptor transgene dieren | 1.080         | 100% Terminal               |   |
| <b>3.4.4.3 Spontane ziekte inductie + tamoxifen behandeling</b> |   |               |                             |   |
|   | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / 6 weken - 8 maanden. Verschillende lijnen beschreven in appendix 3.4.4.3   | 432           | 100% Matig                  | tot max 5% van de dieren kan ernstig ongerief ondervinden |
| <b>3.4.4.4 Arthritis modellen (CIA en CAIA)</b>                 |   |               |                             |   |
|   | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / 6 weken - max 6 maanden. Verschillende stammen zoals beschreven in bijlage 3.4.4.4   | 1.110         | 37% Terminal<br>63% Ernstig |   |
| <b>3.4.4.5 Experimentele autoimmuun encephalomyelitis (EAE)</b> |   |               |                             |   |

**Aanvraagnummer:**  
AVD118002017843

|  |  |     |                                   |  |
|--|--|-----|-----------------------------------|--|
|  | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) /<br>6 weken tot 6 maanden oud.<br>Verschillende stammen<br>beschreven in bijlage 3.4.4.5 | 636 | 21%<br>Terminal<br>79%<br>Ernstig |  |
|--|--|-----|-----------------------------------|--|

#### **Voorwaarden**

*Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**  
AVD118002017843

## 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

**Aanvraagnummer:**  
AVD118002017843

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.

#### **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.

| <b>Inventaris Wob-verzoek W17-07</b> |                             |                        |             |               |              |                          |               |               |             |  |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------|-------------|--|
|                                      |                             | <b>wordt verstrekt</b> |             |               |              | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |             |  |
| <b>nr.</b>                           | <b>document NTS 2017847</b> | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b> | <b>10.1.c</b>            | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |  |
| 1                                    | Aanvraagformulier           |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |  |
| 2                                    | NTS                         | x                      |             |               |              |                          |               |               |             |  |
| 3                                    | Projectvoorstel             |                        |             |               | x            |                          |               | x             |             |  |
| 4                                    | Bijlage animal procedure 1  |                        |             |               | x            |                          |               | x             |             |  |
| 5                                    | Ontvangstbevestiging        |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |  |
| 6                                    | DEC advies                  |                        |             |               | x            |                          |               | x             |             |  |
| 7                                    | Advies CCD                  |                        | x           |               |              |                          |               |               | x           |  |
| 8                                    | Beschikking en vergunning   |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |  |

AVD 11500 2017 847



27 JAN. 2017

1

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

---

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

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Naam instelling of organisatie                      | UMC Utrecht                          |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted]                           |
| KvK-nummer  | 30244197                             |
| Straat en huisnummer                                | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht |
| Postbus   | 12007                                |
| Postcode en plaats                                  | 3501AA Utrecht                       |
| IBAN  | NL27INGB0000425267                   |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               | Universiteit Utrecht                 |

---

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

|                             |                                      |   |
|-----------------------------|--------------------------------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted]                           | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | [Redacted]                           |   |
| Afdeling                    | Reumatologie & Klinische Immunologie |   |
| 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                    | Reumatologie & Klinische Immunologie |   |
| 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 - 2 - 2017 |
| Einddatum  | 1 - 2 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Preventie van pengatinfecties bij gewrichtsdistractie als behandeling van knieartrose
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Preventie van pengatinfecties bij behandeling met externe fixatie
- 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 € 1035 Lege

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

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

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

[Redacted Name and Function]

Utrecht

25-07-2017

[Redacted Signature]



Instantie voor  
Dierenwelzijn  
Utrecht

3

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres  
Bolognalaan 50  
3584 CJ Utrecht

postadres  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

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

uw kenmerk  
ons kenmerk

datum 24 januari 2017  
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 de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht. Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v. de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht, Postbus 12007, 3501AA Utrecht. Bij e-mail correspondentie graag [info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl) in cc plaatsen.

#### **Facturering**

De vergunninghouder zal de leges voor de bijgaande aanvraag voldoen aan de CCD na ontvangst van de factuur. Ik wil u vriendelijk doch dringend verzoeken op de factuur **onderstaand factuuradres te gebruiken** en daarbij het vetgedrukte grootboeknummer vermelden.

#### **Factuuradres**

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

Ik verzoek u vriendelijk de factuur alleen 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: [asc.factuur@uu.nl](mailto:asc.factuur@uu.nl). Graag [info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl) in CC plaatsen.

Met vriendelijke groet



Hoofd Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht



## Format Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
4. 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.

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

Artrose(gewrichtsslijtage) is een groeiend sociaal-economisch probleem en resulteert uiteindelijk in dure en invasieve chirurgische gewrichtvervangende operaties. Deze ingreep is in veel gevallen geen definitieve oplossing aangezien er vaak na 10-15 jaar een revisieoperatie nodig is, met alle mogelijke complicaties zoals een verhoogde kans op infectie en het ontstaan van gecompliceerde breuken. [Felson et al. 2000, Kurtz et al. 2009, Julin et al. 2010]

Gewrichtsdistractie is recentelijk beschikbaar gekomen als gewrichtssparende ingreep voor knieartrosepatienten met bilaterale tibia-femorale artrose. Voor unilaterale artrose kan een standcorrectie van het onderbeen als gewrichtssparende ingreep worden toegepast. Als gevolg van gewrichtsdistractie kan het moment van het plaatsen van een prothese worden uitgesteld. Hierdoor zal revisiechirurgie minder vaak nodig zijn, en zullen er minder complicaties ontstaan. Ook is de behandeling kosteneffectief. [Van der Woude et al. 2016] In meerdere gerandomiseerde studies zijn gezamenlijk meer dan 70 patiënten behandeld en is er structureel weefselherstel en klinische verbetering aangetoond tot 5 jaar na de behandeling. [Intema et al. 2011, Wiegant et al. 2013, Van der Woude et al. 2016] Tijdens deze behandeling wordt het aangedane gewricht voor een periode van 6 weken ontlast middels een extern gefixeerd distractieframe. Dit frame is bevestigd aan het boven- en onderbeen met botpennen die door de huid heen steken.

Hoewel patienten een sterk functioneel herstel doormaken na behandeling met kniedistractie, is er een sterke motivatie nodig vanuit de patiënt omdat de mobiliteit gedurende de behandeling wordt beperkt. Ondanks deze beperking, is herstel van bilaterale tibia-femorale artrose tot op heden alleen mogelijk gebleken met gewrichtsdistractie. Als indicatie voor het effect van deze behandeling, zijn er meerdere patiënten die na de behandeling ook de contra-laterale knie hebben laten behandelen met gewrichtsdistractie. Momenteel ligt de focus van de behandeling ondermeer op de verminderde mobiliteit tijdens de behandeling, zodat de behandeling aan een breder scala van patiënten aangeboden kan worden.

Daarnaast ontwikkelden 59-85% van de humane patiënten in de uitgevoerde studies pengatinfecties als belangrijkste complicatie van gewrichtsdistractie. [Intema et al. 2011, Van der Woude et al. 2016] Deze infecties treden op waar de botpennen door de huid heen steken en worden momenteel succesvol met orale antibiotica behandeld, eventueel aangevuld met pijnstilling. De toenemende problematiek met de ontwikkeling van antibiotica resistente micro-organismen vraagt echter om nieuwe methoden om de ontwikkeling van infecties te voorkomen en behandeling met antibiotica te beperken tot een minimum. [Cunha et al. 1998, Goossens et al. 2005, Wright et al. 2013]

Pengatinfecties kunnen zich zonder adequate behandeling wel ontwikkelen tot een meer ernstige infectie zoals een osteomyelitis. Dergelijke infecties kunnen ertoe leiden dat de botpennen moeten worden verwijderd, en de behandeling moet worden gestaakt. [Nguyen et al. 1986, Mahan et al. 1991, Green et al. 1984] De periode van 6 weken waarin de behandeling plaatsvindt, geeft een hoge kans op ontwikkeling van een infectie bij de open verbinding door de huid. Het voorkomen van deze infecties zou de belasting van de behandeling voor de patiënt aanzienlijk verkleinen, en het gebruik van antibiotica verminderen.

Op basis van de waargenomen complicaties bij gewrichtsdistractie is een systematische literatuurreview uitgevoerd naar de preventie van pengatinfecties bij externe fixatie. [manuscript in voorbereiding] Zes categorieën van preventieve methoden werden geïdentificeerd. Door verschillen in studieopzet, preventiemethode en het gebruik aan duidelijke definities, waren studies echter slecht vergelijkbaar. Bovendien gaf geen enkele studie voldoende bewijs voor

de effectiviteit van een specifieke methode in zowel *in vitro*, *in vivo* dierenstudies en in humane studies.

De meest kansrijk geachte methode voor preventie van pengatinfecties die in de review werd gevonden, is het aanbrengen van een lage elektrische stroom op de botpennen gedurende de behandeling. In tegenstelling tot andere methoden, is deze in verschillende op micro-organismen gerichte *in vitro* studies en in één *in vivo* geitenstudie voor dit doeleinde toegepast, waarbij klinisch relevante vermindering van infecties werd aangetoond. [Van der Borden et al. 2004, Van der Borden et al. 2005, Van der Borden et al. 2007]

De stroom is dusdanig [REDACTED] en deze kan [REDACTED]. Humane studies met deze nieuwe behandeling zijn tot op heden niet gerapporteerd. De uitgevoerde studies laten echter een aantal aspecten onderbelicht die voor een eventuele humane toepassing bij behandeling van kniedistractie verder onderzoek vereisen. Een van deze aspecten is de beperkte duur van de behandeling, waardoor het onbekend is welk effect kan worden verwacht wanneer [REDACTED] wordt toegepast. Er is getracht in contact om in contact te komen met de betreffende onderzoeksgroep, o.a. met het oog op niet gepubliceerde data die meer inzicht kunnen verschaffen. Deze stond niet open voor verdere uitwisseling van data.

Het exacte werkingsmechanisme van de methode is niet bekend, maar lijkt meerledig te zijn. Er zijn indicaties dat het oppervlak door toepassing van de stroom onaantrekkelijk wordt voor micro-organismen om aan het oppervlak te hechten en een biofilm te ontwikkelen, en daarmee de infectie te voorkomen. Daarnaast is niet uitgesloten dat de ionen die rond de botpennen vrijkomen, verantwoordelijk zijn voor het remmen van de bacteriegroei, of zelfs het beschadigen van de celwanden, en daarmee de ontwikkeling van een infectie voorkomen. [Van der Borden et al. 2004, Luo et al. 2005, Gabi et al. 2010]

De lokale effecten van de stroom op de botpennen en op de verschillende direct omliggende weefsels zoals het bot en de weke delen, zijn tot op heden zeer beperkt geanalyseerd. Deze informatie is echter wel essentieel voordat deze behandeling veilig humaan toegepast kan worden. Om deze aspecten te kunnen onderzoeken, is een langdurige toepassing van de nieuwe methode op levend weefsel nodig. Het gebrek aan *in vitro* modellen waarin analyse van alle betrokken weefsels mogelijk is en de bijwerkingen kunnen worden onderzocht, vereisen een eerste evaluatie in een *in vivo* dierenmodel.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Dit project heeft tot doel om de effectiviteit van de methode voor preventie van pengatinfecties door middel van het blootstellen van pengaten aan een elektrische stroom te testen voor een klinisch relevante periode. Daarnaast zal worden onderzocht of de methode gedurende een dergelijk periode kan worden toegepast zonder bijeffecten die een veilige toepassing verhinderen. Dit onderzoek levert een getest [REDACTED], dat aansluitend humaan getest kan worden.

Vanuit een langdurige samenwerking tussen de afdelingen Orthopedie en Reumatologie, is gewrichtsdistractie inmiddels ontwikkeld tot een regulier toegepaste behandeling voor tibia-femorale artrose. Verdere optimalisatie van de behandeling vindt daarnaast voortdurend plaats in samenwerking met de afdelingen Medische Technologie & Klinische Fysica (optimalisatie van de gebruikte medische instrumenten) en met de afdeling Medische Microbiologie (preventie en behandeling van pengatinfecties). Met de laatst genoemde wordt ondermeer de stamselectie voor deze studie uitgevoerd. Daarnaast faciliteren zij in de microbiologische analyses.

Binnen deze laatste samenwerking is de methode reeds *in vitro* getest en er worden momenteel optimalisaties van de methode uitgevoerd (*in vitro*; naar het [REDACTED] Bij de uitgevoerde *in vitro* experimenten is een suspensie van een [REDACTED]

stam blootgesteld aan een [REDACTED]. De suspensie werd blootgesteld aan de stroom middels [REDACTED] als de botpennen die in de kniedistractiebehandeling worden gebruikt. Na [REDACTED] werd de [REDACTED] van de in de suspensie [REDACTED] gemeten middels [REDACTED]. Daarnaast is het [REDACTED] geanalyseerd met confocale microscopie.

---

### 3.3 Belang

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

Gewrichtsdistractie heeft als behandeling voor eindstadium knieartrose klinische verbetering laten zien bij tenminste driekwart van de behandelde patiënten voor een periode van tenminste 5 jaar. Ook is er structureel weefselherstel op röntgenfoto's en MRI aangetoond. Hoewel patiënten de belasting van de behandeling over het algemeen vinden opwegen tegen het klinisch herstel, vereist de behandeling een sterke motivatie van patiënten. Bovendien heeft ongeveer de helft van de patiënten last van pengatinfecties als belangrijkste complicatie. Daarnaast vormen pengatinfecties bij alle andere vormen van externe fixatie, waaronder de fixatie van complexe fracturen, een veelvoorkomende complicatie. Bij gebleken geschiktheid van de te onderzoeken preventieve methode, is toepassing voor andere behandelingen dan ook aannemelijk.

Voor geen enkele andere bekende methode voor pengatinfectiepreventie is vanuit de systematische literatuurreview bekend dat er *in vivo* een gelijke of betere preventieve werking is behaald dan door toediening van een elektrische stroom. [manuscript in voorbereiding] Dit project maakt het mogelijk om deze veelbelovende methode door te ontwikkelen voor humane toepassingen.

Een humane toepassing van deze techniek zal gewrichtsdistractie als behandeling dragelijker maken, en daarmee een grotere patiëntengroep kunnen bereiken. Ook zal het gebruik van antibiotica afnemen in de preventie en de behandeling van pengatinfecties bij deze patiënten, waarmee de daarmee gepaard gaande risico's (o.a. resistentie) worden gereduceerd.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Op basis van de resultaten van de uitgevoerde systematische literatuurreview, is besloten om de toepassing van een elektrische stroom als preventiemethode voor pengatinfecties verder te onderzoeken, waarbij de effectiviteit van de preventiemethode en een veilige *in vivo* toepassing centraal staan. Daartoe zijn de condities van het elektrisch signaal in een eerste stap *in vitro* onderzocht en geoptimaliseerd. De uitgevoerde *in vitro* experimenten zijn gebaseerd op de experimenten zoals die door Van der Borden et al. zijn beschreven, en er is getracht om die resultaten in ons eigen pilotonderzoek te repliceren. Daartoe is telkens een suspensie van [REDACTED] blootgesteld aan een ander elektrisch signaal voor [REDACTED]. De uitkomsten van ons pilotonderzoek waren in lijn met de resultaten van Van der Borden et al. en zijn samen met de resultaten van de *in vivo* studie (geitenmodel) die door die groep is uitgevoerd, gebruikt om de [REDACTED] van het elektrische signaal te definiëren zoals die in dit project worden onderzocht.

In dit project wordt gestreefd naar bevestiging van de *in vitro* geoptimaliseerde condities voor toepassing van een elektrische stroom in de preventie van pengatinfecties. De meest optimale condities zoals die *in vitro* zijn bepaald, worden getest in een klinisch gelijkwaardige situatie waarbij de *in vivo* condities zoals die gelden bij humane gewrichtsdistractie behandeling waar mogelijk worden nagebootst. Gelijke [REDACTED] van botpennen zullen daarom voor de [REDACTED] worden geëvalueerd.

---

Preventief versus curatief

De toepassing van de elektrische stroom zal *in vivo* plaatsvinden na het aanbrengen van een besmetting in het pengat, aan het einde van de ingreep waarin de botpennen worden geplaatst.

De stamselectie gebeurt in samenwerking met de afdeling microbiologie, waarbij een stam zal worden geselecteerd die tijdens de verschillende experimenten binnen dit project kan worden onderscheiden van de bij het schaap reeds op de huid aanwezige stammen. Het pathogeen waarmee de infectie wordt geïnduceerd komt van nature in een [REDACTED] op de huid van het schaap voor, maar kan zich door het aanwezige pengat sneller tot een infectie ontwikkelen.

Omdat direct na het plaatsen van de pennen pathogenen worden aangebracht en de elektrische stroom wordt toegepast, wordt deze aanpak als preventief en niet als curatief beschouwd.

---

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

---

##### Model

Volgend uit de behoefte om een klinisch gelijkwaardige configuratie te testen, is er gekozen voor een toepassing van het elektrische signaal in een schapenmodel, overwegende dat:

- De anatomie van het schaap voldoende gelijkwaardig is aan de mens om de botpennen en plaatsingsmethode zoals die humaan wordt gehanteerd, toe te kunnen passen. Kleinere diermodellen, waaronder het konijn en de hond, zijn overwogen maar op basis van botafmetingen en de toepasbaarheid van de benodigde botpennen niet gekozen.
- Kans op verstoring van de testcondities door fysieke activiteit van het dier gedurende de studie beperkter is dan in toepassing in een geitenmodel (waarin een gelijke methodiek is onderzocht [Van der Borden et al. 2007]).
- Infecties met het gekozen pathogeen zullen ontwikkelen wanneer er geen interventie met antibiotica is.

Voor alle botpennen per dier wordt het [REDACTED]. Daarmee wordt gecompenseerd voor de [REDACTED] in de ontwikkeling van een botpeninfectie (verschillen tussen [REDACTED]).

Op basis van een 3-weekse toepassing van hetzelfde principe in een *in vivo* geitenmodel, waarin een elektrisch signaal is gebruikt in hetzelfde bereik als het in dit project voorgestelde elektrische signaal, is het echter aannemelijk dat er een sterk preventief effect zal worden gevonden.

Transcutane botpennen zoals humaan toegepast, worden in een gelijke configuratie aan de laterale zijde geplaatst (onderlinge afstand en anatomische positie) zoals bij gewrichtsdistractie. Een gelijke keuze van [REDACTED] vanuit de functie als [REDACTED]. Ook is de klinisch toegepaste configuratie relevant omdat deze is [REDACTED]. Het plaatsen van de botpennen zal onder volledige narcose gebeuren.

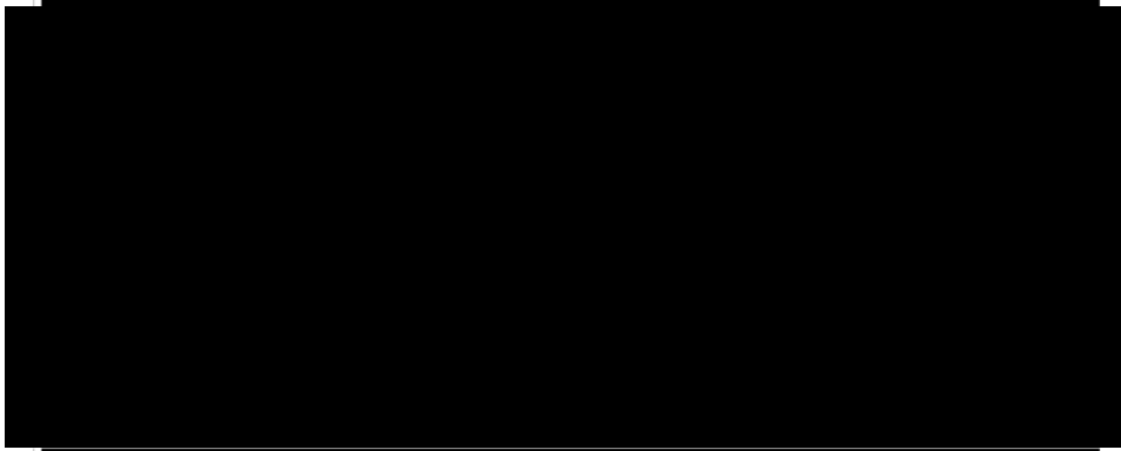
Pengaten worden vervolgens ofwel onbehandeld, of geïnfecteerd met een met pengatinfecties geassocieerde [REDACTED]. De infectie zal direct na het plaatsen van de botpennen worden geïnduceerd tijdens de ingreep. [Van der Borden et al. 2007]

De methode is door onze onderzoeksgroep *in vitro* getest voor condities zoals die vanuit de literatuur bekend zijn [Van der Borden et al. 2004, 2005, 2007]. Daarvoor zijn, klinisch relevante, [REDACTED] gedurende een [REDACTED] terwijl deze werden blootgesteld aan verschillende [REDACTED]. De uitkomst van de experimenten, uitgedrukt in de resterende [REDACTED] en de [REDACTED] (met confocale microscopie) was in lijn met de literatuur.



#### Toediening elektrisch signaal

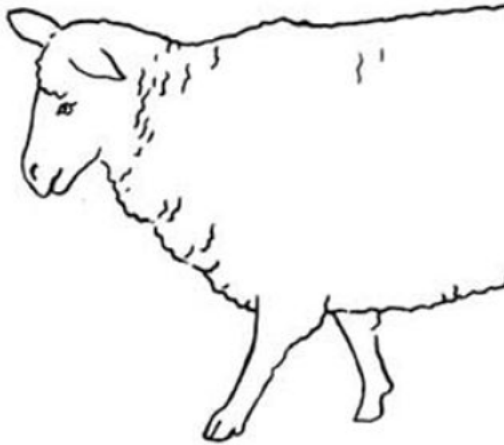
Een [redacted] voor het aanbrengen van het elektrische signaal aan de botpennen (figuur 1). Het apparaat is voor [redacted] en wordt vanuit een [redacted]. Na het plaatsen van de botpennen wordt er [redacted]. De botpennen dienen voldoende [redacted] te kunnen inspecteren en indien nodig te worden [redacted] wordt tijdens de ingreep voor het plaatsen van de [redacted] opgemeten, en pennen worden indien nodig [redacted].



*Figuur 1 Apparaat voor het aanbrengen van een elektrisch signaal op de botpennen*

De configuratie van de botpennen is gebaseerd op de humane kniedistractiebehandeling. Afwijkend daarin zullen de pennen binnen dit project aan de buitenzijde van de poot worden geplaatst (unilateraal), en niet bilateraal zoals dat humaan gebeurt. Dit is niet alleen omdat er aan de binnenzijde minder ruimte is, maar ook wordt het ongerief daardoor beperkt. Uit eerdere studies met gewrichtdistractie in de hond (DEC 2007.III.02.029) die binnen onze groep zijn uitgevoerd, hebben we laten zien dat het ongerief van de [redacted] botpennen beperkt is.

Figuur 2 geeft een beeld van de penplaatsing, en de toepassing van het apparaat dat de pennen van een elektrisch signaal voorziet. De [redacted] worden [redacted] naast het [redacted] geplaatst, waarbij de [redacted] [redacted] [redacted]. Deze [redacted] van botpennen bij kniedistractie.



Figuur 2 De configuratie van de botpennen in [redacted]. [redacted] wordt voorzien van een apparaat dat een elektrisch signaal kan leveren

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 heeft tot doel om vanuit *in vitro* vergaarde condities, via een dierenmodel naar een humane toepassing van een elektrisch signaal voor preventie van pengatinfecties te werken.

#### Fasering

De fasering van het project is schematisch weergegeven in figuur 3, waarbij de keuzemomenten om een vervolgfase te starten zijn aangegeven.



aangebracht op pennen waarbij een infectie van de pengaten wordt geïnduceerd. In groep 2 wordt het elektrisch signaal aangebracht zonder dat er een infectie van de pengaten wordt geïnduceerd.

Naast 2 testgroepen wordt er 1 positieve controlegroep gekozen, waarin er wel een infectie wordt geïnduceerd, maar geen elektrisch signaal wordt aangebracht. De controlegroep wordt gebruikt om aan te tonen dat het gekozen microorganisme in de gekozen periode van blootstelling daadwerkelijk een infectie van de pengaten veroorzaakt die behandeling vereist. In de vervolgfases zullen enkel testgroepen worden gevormd.

De elektrische signalen die fase I worden getest, zijn per groep:

Groep 1a: Signaal 1: [redacted]

Groep 1b: Signaal 1: [redacted]

Groep 2a: Signaal 2: [redacted]

Groep 2b: Signaal 2: [redacted]

Bij een effectiviteit lager dan 80% (percentage niet-ontwikkelde infecties) zal fase II worden gestart.

*Fase II: Evaluatie* [redacted]

Wanneer blijkt dat de resultaten *in vivo* onvoldoende effectief zijn, zal er een volgende fase (fase II) van dit project een *in vivo* [redacted] van het elektrische signaal worden gestart, waarbij eerst enkel een [redacted] zal worden onderzocht in twee studiegroepen.

De elektrische signalen die fase II worden getest, zijn per groep:

Groep 4a: Signaal 3: [redacted]

Groep 4b: Signaal 3: [redacted]

Groep 5a: Signaal 4: [redacted]

Groep 5b: Signaal 4: [redacted]

Bij een effectiviteit lager dan 80% zal een vervolgfase worden gestart.

*Vervolg fases*

Gelijk aan de opzet van fase II, kan er bij onvoldoende preventieve werking van het elektrische signaal in zowel fase I als fase II, gekozen worden voor één of meerdere vervolgfases. Wanneer dit nodig is, kan worden geconcludeerd dat de *in vitro* studies die zijn gedaan, onvoldoende transleerbaar zijn naar een *in vivo* model. De verdere optimalisatie van het elektrische signaal zal dan worden uitgevoerd in een aanvullende dierenstudie waarvoor een nieuw projectvoorstel of een aanvulling op dit project zal worden gedaan, waarbij het elektrische signaal tenminste binnen de volgende bereiken zal worden gekozen; voor signalen buiten het onderstaande bereik is bekend dat deze een veilige toepassing kunnen verhinderen:

- [redacted]
- [redacted]

- [REDACTED]
- [REDACTED]

Bij humane toepassing zal er altijd een pengatverzorgingsprotocol worden gehanteerd. Literatuur beschrijft zowel een positieve als een negatieve bijdrage van deze protocollen aan de ontwikkeling van pengatinfecties, waardoor effecten zoals die onder I en II zullen worden verkregen, kunnen veranderen. De combinatie van een standaard toegepast wondverzorgingsprotocol met de geoptimaliseerde condities, zullen in het laatste deel van het project worden onderzocht wanneer er onvoldoende preventieve werking is aangetoond met enkel de toepassing van het elektrische signaal..

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

| Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 1          | Schaapmodel – Preventie van pengatinfectie met een elektrisch signaal |
| 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](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

| 1.1        | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.                                | 11500   |            |                |   |   |
|------------|---|---|------------|----------------|---|---|
| 1.2        | Vul de naam van de instelling of organisatie in.                      | UMC Utrecht   |            |                |   |   |
| 1.3        | Vul het volgnummer en het type dierproef in.                          | <table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Schaapmodel – Preventie van pengatinfectie met een elektrisch signaal</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 1 | Schaapmodel – Preventie van pengatinfectie met een elektrisch signaal |
| Volgnummer | Type dierproef  |   |            |                |   |   |
| 1          | Schaapmodel – Preventie van pengatinfectie met een elektrisch signaal |   |            |                |   |   |

*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.

##### Experimentele aanpak

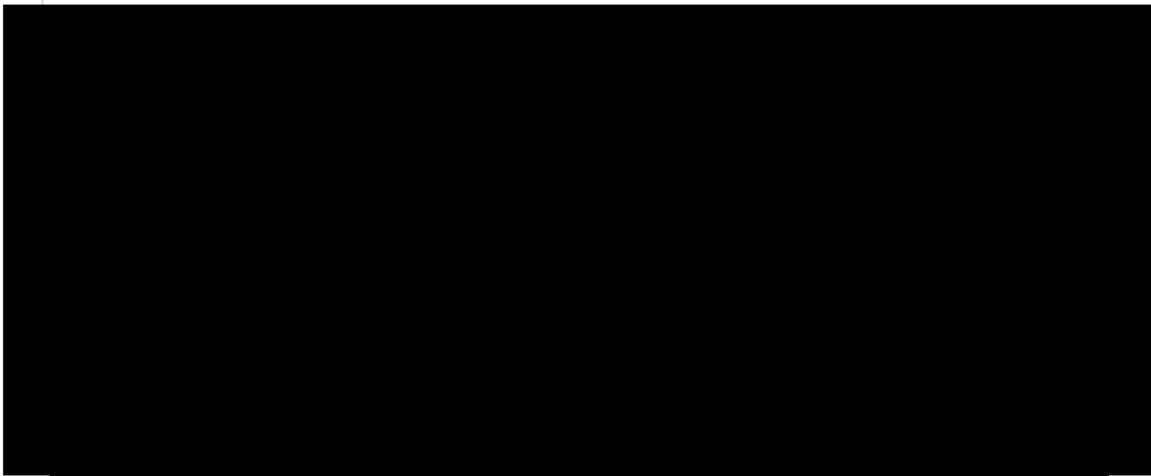
In dit project wordt een nieuwe methode voor de preventie van pengatinfecties getest op effectiviteit en negatieve bijwerkingen. De methode is gebaseerd op het blootstellen van de botpennen aan een kleine elektrische stroom. De specificaties van de methode worden geoptimaliseerd naar een [REDACTED]

Daartoe worden er in schapen botpennen geplaatst in een configuratie zoals die humaan wordt toegepast voor kniedistractie als behandeling van artrose. In

één achterpoot worden er lateraal 4 botpennen in een anatomische posities gelijk aan de humane situatie geplaatst: een set van 2 pennen in het femur en een set van 2 pennen in de tibia worden geplaatst, waarbij de [REDACTED], zoals dat humaan met gebruik van een boorhulpmiddel gebeurt. De pennen zijn daarnaast [REDACTED] die humaan worden geplaatst en kunnen in een enkele handeling worden geplaatst door de zelf-borende en zelf-tappende eigenschappen. Een kleine incisie volstaat om een botpen aan te brengen.

#### Methode van infectiepreventie

De botpennen worden blootgesteld aan een elektrisch signaal met een [REDACTED], waarvan bekend is dat er geen directe schadelijke effecten optreden. Een [REDACTED] [REDACTED] is waarneembaar en geeft vanaf [REDACTED] [vanuit de norm voor medische elektrische apparatuur: IEC-60479-1]. De gekozen methode maakt gebruik van een elektrisch signaal van [REDACTED] bij [REDACTED]. Dit signaal wordt door een daarvoor ontwikkeld apparaat voor [REDACTED] geleverd (figuur 1). [REDACTED] is er [REDACTED] nodig. Het apparaat wordt [REDACTED] voor [REDACTED], is geschikt [REDACTED] en wordt vanuit [REDACTED]



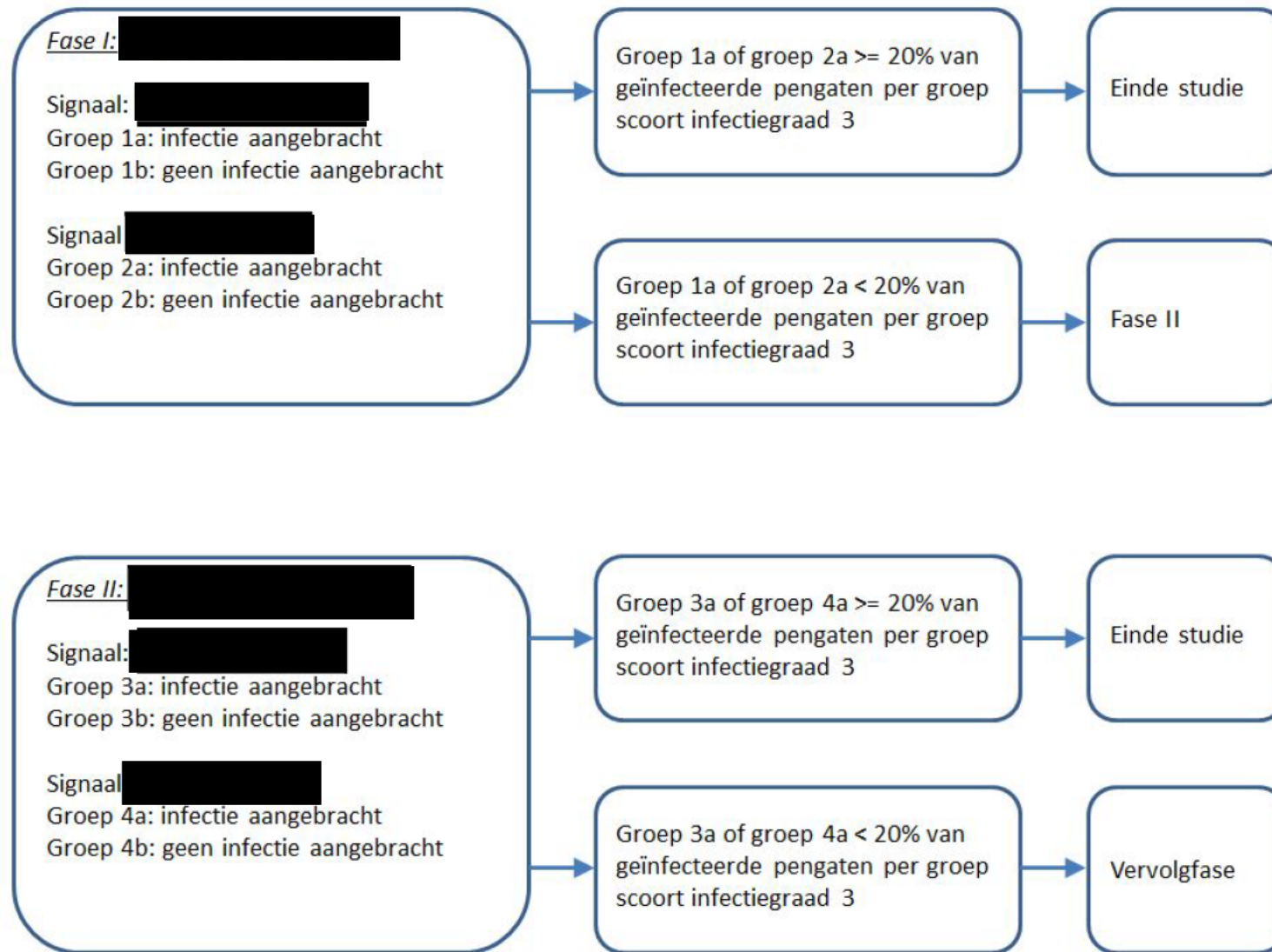
Figuur 1 *Apparaat voor het aanbrengen van een elektrische stroom op de botpennen*

#### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameter vormt de registratie van de ontwikkelde gradatie 3 botpeninfecties voor de verschillende stroomcondities, waarmee de effectiviteit van het elektrische signaal wordt bepaald. De infectiegradatie wordt dagelijks onafhankelijk door twee onderzoekers bepaald volgens de methode zoals beschreven door Van der Borden et al. (2007). Score 1 wordt toegekend wanneer er geen tekenen van een infectie zichtbaar zijn; score 2 bij een ontsteking zonder pus; score 3 bij een ontsteking met pus. Vanaf score 2 is er sprake van een botpeninfectie en bij score 3 wordt behandeling met antibiotica gestart (elektrisch signaal blijft aanwezig) in overleg met de betrokken dierenarts. Daarnaast zal het pengat vrij worden gemaakt van de aanwezige biofilm, en dagelijks worden gereinigd voor de duur van de behandeling met antibiotica.



Per fase zal er bij een effectiviteit lager dan 80% een volgende fase worden gestart voor [redacted] van het elektrische signaal. De fasering is weergegeven in figuur 2. Voor een vervolffase zal er een aanvulling op dit project worden gedaan, of een nieuw projectvoorstel worden ingediend.



## Figuur 2 *De projectfasering*

Secundair worden de weefsels rond het pengat (bot, weke delen, huid) post mortem geanalyseerd om een gedetailleerd beeld van de langdurige effecten van het elektrische signaal te bepalen.

Als secundaire analyse wordt daarnaast met microCT de verbinding tussen het bot en de botpen geanalyseerd en worden er histologische analyses uitgevoerd van de weefsels rond het pengat (bot, spier, huid).

Per dier zijn [REDACTED] die op het eindpunt als volgt worden geanalyseerd:

- Alle penverbindingen worden doorlicht (C-boog) bij opoffering.
  - i. Voor 1 pengat wordt de pen uit het bot verwijderd en getest op de aanwezigheid van levende microorganismen. De huid rond het pengat wordt verwijderd en viabiliteit van de aanwezige microorganismen wordt getest (confocale fluorescentie microscopie).
  - ii. 1 pen wordt uit het pengat verwijderd, de aanwezige biofilm wordt gefixeerd, en viabiliteit van de microorganismen wordt getest. Ook de huid rond het pengat wordt verwijderd en op viabiliteit getest. Het bot wordt geïsoleerd voor beeldvorming met microCT. De huid rond het pengat wordt verwijderd en viabiliteit van de aanwezige microorganismen wordt getest.
  - iii. Het bot met 1 pen wordt vrijgeprepareerd en beeldvorming wordt gedaan met microCT.
  - iv. De laatste pen wordt samen met de weke delen en het bot geprepareerd voor histologische analyse van het pengat.

Primaire uitkomstparameter:

- Het aantal infecties dat ontwikkeld in de studieperiode van 6 weken (plaatsing van het systeem op dag 0)

Secundaire uitkomstparameters:

- De tijd in dagen tot het ontwikkelen van een gradatie 2 en 3 infectie
- Histologie van de weefsels (bot en weke delen) rond de pengaten na terminatie
- Beeldvorming bot-botpen verbinding met röntgenfoto's en microCT

Afhankelijk van het verloop van de studie, kan er ook inzicht ontstaan in:

- Locatieafhankelijkheid in de ontwikkeling van infectie (femur versus tibia)
- Effectiviteit van de methode na antibioticagebruik

## Overzicht uitkomstparameters

Dagelijks:

- Scoring van pengatinfecties
- Registratie van [REDACTED] van het pengat (controle van aanwezige elektrische signaal)

Wanneer infectiegraad 3 wordt bereikt:

- Microbiologische evaluatie van de pengaten in het geval van infectie (graad 3) ter controle

Eindpunt:

- Beeldvorming bot-botpen (röntgen/uCT)
- Histologie huidweefsel rondom pen
- Histologie botweefsel rondom pen

---

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

De behandeling omvat het plaatsen van 1 set van 2 botpennen in het bovenbeen (femur) van het schaap, en 1 set van 2 pennen in het onderbeen (tibia) van het schaap tijdens een chirurgische ingreep. [REDACTED] tussen de [REDACTED], en er worden botpennen gebruikt zoals die in de humane klinische praktijk worden toegepast (zelf-borende en zelf-tappende botpennen, [REDACTED]). De pennensets worden aan de laterale zijde naast het kniegewricht geplaatst.

Volgend op de plaatsing van de botpennen, worden bij de dieren waar een infectie geïnduceerd moet worden, de pengaten geïnfecteerd met een [REDACTED] die bij schapen op de huid voorkomt en [REDACTED] is, waardoor een gelijkwaardig type infectie wordt verkregen. Daarbij worden de pengaten eerst droog gemaakt, waarna er [REDACTED] in het pengat wordt gedruppeld en er met een volgende stap wordt gewacht tot dit in het pengat ingetrokken is. [Van der Borden et al. 2007]

Daarna wordt aan de botpennen een [REDACTED] apparaat bevestigd voor de [REDACTED]. Dit apparaat levert het gewenste elektrisch signaal, dat per studiegroep verschilt. De specificaties van het signaal zijn voor de [REDACTED] gelijk. Het apparaat is voor [REDACTED] en wordt na [REDACTED].

Wanneer er een pengatinfectie ontwikkelt bij een dier, zal er in overleg met de betrokken dierenarts worden behandeld met antibiotica wanneer deze gradatie 3 bereikt volgens de scoringmethode die als primaire uitkomstmaat wordt gebruikt. In dat geval zal het geïnfecteerde pengat voor de duur van de antibioticakuur dagelijks worden gereinigd. Daarnaast zal pijnstilling worden gegeven wanneer dat nodig wordt geacht.

#### Behandelingsduur

De behandeling die in deze studie wordt gedaan, is bedoeld om de effectiviteit en veiligheid voorafgaand aan een humane toepassing te onderzoeken. Deze aspecten zijn voor het elektrische signaal onbekend voor de duur van de humane toepassing. Om die reden is de behandelingsduur in deze studie gelijk gekozen aan de [REDACTED].

---

In een eerste fase zal de meest effectieve frequentie worden getest van het elektrische signaal dat *in vitro* behaald is. Vervolgens worden de effecten van een [REDACTED] in fase II getest voor [REDACTED] die in fase I worden gebruikt. Bij onvoldoende effectiviteit (< 80%) zal er een vervolgfase worden gestart (als aanvulling op dit project of in een separaat projectvoorstel) waarin [REDACTED] van het [REDACTED] worden [REDACTED]. Wanneer er onvoldoende effect binnen de [REDACTED] van het signaal wordt behaald, zal de combinatie van [REDACTED] met een [REDACTED] worden getest.

#### Indeling studiegroepen per fase

##### *Fase I: Evaluatie* [REDACTED]

De twee elektrische signalen die *in vitro* het meest effectief bleken, worden in fase I getest. Daarnaast zal er een positieve controlegroep worden gevormd.

Groep 1a: Signaal 1: [REDACTED], zie ook figuur 3), infectie aangebracht

Groep 1b: Signaal 1: [REDACTED] geen infectie aangebracht (negatieve controle)

Groep 2a: Signaal 2: [REDACTED] infectie aangebracht

Groep 2b: Signaal 2: [REDACTED] geen infectie aangebracht (negatieve controle)

Groep 3: Positieve controlegroep: botpennen worden geplaatst, een infectie wordt geïnduceerd, een apparaat voor toediening van stroom wordt aangebracht. Er wordt geen elektrische stroom toegediend.

Figuur 3 Weergave van de [REDACTED] van het hele [REDACTED]

## Fase I

### Groep 1a: [REDACTED]

- Infectie geïnduceerd
- Elektrisch signaal

### Groep 1b: [REDACTED]

- Geen infectie geïnduceerd
- Elektrisch signaal

### Groep 2a: [REDACTED]

- Infectie geïnduceerd
- Elektrisch signaal

### Groep 2b: [REDACTED]

- Geen infectie geïnduceerd
- Elektrisch signaal

### Groep 3: positieve controle

- Infectie geïnduceerd
- Geen elektrisch signaal

Figuur 4 Overzicht van testgroepen en testcondities die op basis van *in vitro* resultaten gekozen zullen worden in een eerste fase van het project.

*Fase II: Evaluatie 150uA signaal met variërende signaalfrequentie*

Groep 4a: Signaal 3: [redacted]), infectie aangebracht  
Groep 4b: Signaal 3: [redacted]), geen infectie aangebracht (negatieve controle)

Groep 5a: Signaal 4: [redacted] infectie aangebracht  
Groep 5b: Signaal 4: [redacted] geen infectie aangebracht (negatieve controle)

## Fase II

Groep 1a: [redacted]

- Infectie geïnduceerd
- Elektrisch signaal

Groep 1b: [redacted]

- Geen infectie geïnduceerd
- Elektrisch signaal

Groep 2a: [redacted]

- Infectie geïnduceerd
- Elektrisch signaal

Groep 2b: [redacted]

- Geen infectie geïnduceerd
- Elektrisch signaal

*Figuur 5* Overzicht van testgroepen en testcondities die op basis van *in vitro* resultaten gekozen zullen worden in de tweede fase van het project.

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

De primaire uitkomst is de categorische scoring (1-3) van de infectie per pengat, die door 2 onderzoekers per pengat dagelijks zal worden bepaald.

Daaruit volgen maximaal 6 categorische variabelen. In overleg met [redacted], eveneens [redacted], is een algemene vuistregel waarbij een categorische score van meer dan 5 punten als een continue variabele mag worden beschouwd.

Op basis van deze vuistregel en de *in vivo* studie waarin de preventiemethode is getest in een geitenmodel [Van der Borden et al. 2007], is de volgende sample-size berekening uitgevoerd:

Bij een score van 2 of 3 is er sprake van een pengatinfectie. De resultaten van de studie door Van der Borden et al. (2007) voor de score 2 zijn als volgt:  
1 uit de 9 botpennen heeft een graad 2 infectie in de behandelde groep = 11.11%  
8 uit de 9 botpennen hebben een graad 2 infectie in de onbehandelde groep = 88.89%

Vanuit het oogpunt van optimalisatie, wordt een verschil in uitkomst tussen 2 elektrische signalen als relevant verschil beoordeeld wanneer er een minimale effectgrootte van 0.8 wordt waargenomen tussen twee testgroepen. Er is een alpha van 0.05 en een power van 0.8 gekozen waarbij 2 onafhankelijke groepen worden vergeleken op 1 primaire uitkomstparameter. Daarnaast is er op basis van de literatuur geen indicatie dat een elektrisch signaal de ontwikkeling van een pengatinfectie kan stimuleren, wat de volgende eenzijdige analyse rechtvaardigt.

De analyse is uitgevoerd met G\*Power 3.1.9.2:

**z tests** – Proportions: Difference between two independent proportions

**Analysis:** A priori: Compute required sample size

|                |                             |              |
|----------------|-----------------------------|--------------|
| <b>Input:</b>  | Tail(s)                     | = One        |
|                | Proportion p2               | = 0.1111     |
|                | Proportion p1               | = 0.8889     |
|                | $\alpha$ err prob           | = 0.05       |
|                | Power (1- $\beta$ err prob) | = 0.8        |
|                | Allocation ratio N2/N1      | = 1          |
| <b>Output:</b> | Critical z                  | = -1.6448536 |
|                | Sample size group 1         | = 4          |
|                | Sample size group 2         | = 4          |
|                | Total sample size           | = 8          |

Per testgroep worden er 5 dieren gebruikt om de effectiviteit aan te tonen. Daarin is 1 extra dier meegenomen om eventuele uitval door complicaties op te kunnen vangen.

---

## B. De dieren

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

Binnen deze studie zullen volwassen schapen worden gebruikt die afkomstig zijn uit de veehouderij. Er wordt aangenomen dat de primaire uitkomstmaat binnen deze studie onafhankelijk is van het geslacht. Echter, op basis van de beschikbaarheid van dieren wordt verwacht dat er volwassen vrouwelijke worden gebruikt. Hoewel de herkomst van de dieren naar verwachting geen invloed heeft op de primaire uitkomstmaat, zijn er voldoende dieren beschikbaar vanuit een dicht bij het dierenlaboratorium gelegen bedrijf, wat de voorkeur geniet op basis van de logistieke mogelijkheden.

In iedere projectfase zijn er 5 dieren per testgroep nodig om de effectiviteit van de methode aan te tonen, waarbij een volgende optimalisatiestap na fase II alleen zal worden uitgevoerd wanneer er een effectiviteit van minder dan 80% tussen de onderzochte condities wordt gevonden. Door een beperkt bereik van de condities van het elektrisch signaal, zal het aantal fases beperkt blijven. Bij het volledig doorlopen van fase I en II van het project, zullen daar  $5 \times 5$  (fase I) +  $4 \times 5$  (fase II) = 45 dieren voor nodig zijn. Voor iedere volgende fase zullen  $4 \times 5 = 20$  dieren nodig zijn. Een maximum van twee aanvullende fases is ingeschat op basis van de uiterste karakteristieken die voor het elektrische signaal kunnen worden gekozen.

Op basis van fase I, II, en twee aanvullende fasen, zal er binnen deze studie een totaal van 85 dieren nodig zijn.

### 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:** De methode die in dit project wordt onderzocht is voorafgaand geoptimaliseerd in *in vitro* studies. Die condities kunnen echter niet de complexe afweermechanismen die in een levend organisme aanwezig zijn. Ondanks de zeer goede *in vitro* resultaten, zal de effectiviteit ook in een representatieve omgeving moeten worden bevestigd. Daarnaast is de toepassing *in vivo* onvoldoende bekend om uit te sluiten dat er bijwerkingen optreden die bij humane toepassing uitgesloten moeten worden. Het testen in het gekozen dierenmodel is om die redenen essentieel voor de voorgestelde periode van 6 weken.

**Vermindering:** Door de optimalisatie die tijdens *in vitro* studies is uitgevoerd, is er een goede indicatie van de benodigde specificaties voor de nieuwe methode. In een stapsgewijze aanpak zullen de optimale specificaties voor de *in vivo* toepassing verder worden bepaald, waarbij een maximaal effect bij een minimale blootstelling wordt nagestreefd.

Om dat te bepalen zullen de condities stapsgewijs worden aangepast. Er zal gelden dat een grotere afwijking van de tijdens *in vitro* behaalde resultaten tot het testen van meer condities in het dierenmodel zal leiden (meer fases). Het aantal condities dat kan worden getest in het bereik waarvan geen bijeffecten bekend zijn, is echter beperkt.

**Verfijning:** In dit project wordt er gestuurd op optimalisatie van de preventiemethode om een humane toepassing mogelijk te maken. Vanuit die gedachte is er gekozen voor een configuratie van botpennen zoals die humaan wordt toegepast. Dit vereist een diersoort waarbij de anatomie deze configuratie toelaat. Dit beperkte de opties tot het schaap of de geit. Verder is overwogen dat er voor de duur van de experimenten [REDACTED], waarvan de pengaten



zullen worden geïnfecteerd. Fysieke activiteit van het dier kan de kans op kruisbesmetting vergroten. Daarnaast verhoogt fysieke activiteit de kans op beschadiging van de aangebrachte botpennen (al zullen deze worden afgeschermd), en daarmee op schade bij het dier. Op basis van deze overweging is de keuze voor het schaap gemaakt.

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 worden in principe in groepsverband gehuisvest.

De ingreep gebeurt onder volledige narcose. Indien er een infectie graad 3 ontwikkelt, zal er in overleg met een dierenarts behandeld worden met antibiotica, en indien nodig pijnstilling worden gegeven.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding



Op basis van literatuur en *in vitro* behaalde resultaten: < 10%.

### 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.

Ingeschat ongerief gedurende de studie:

- Anesthesie voor botpenplaatsing en offeren: matig
- Risico op trauma ter hoogte van botpen: licht
- Ontwikkelen van pengatinfecties: matig
- Dagelijkse scores: licht

Cumulatief wordt het risico 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 > Ga verder met de ondertekening.

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

Histologie van de betrokken weefsels (bot, weke delen, huid) postmortem ten behoeve van de langetermijneffecten van de toegepaste methode.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002017847

**Bijlagen**

2

Datum 26 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 januari 2017. Het gaat om uw project "Preventie van pengatinfecties bij gewrichtsdistractie als behandeling van knieartrose". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002017847. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

**Datum:**

26 januari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD115002017847

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



**Datum:**  
26 januari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD115002017847

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker  
Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Afdeling: Reumatologie & Klinische Immunologie  
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 februari 2017  
Geplande einddatum: 1 februari 2022  
Titel project: Preventie van pengatinfecties bij gewrichtsdistractie als behandeling van knieartrose  
Titel niet-technische samenvatting: Preventie van pengatinfecties bij behandeling met externe fixatie  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1035,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Utrecht  
Datum: 25 januari 2017

**Datum:**  
26 januari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD115002017847





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002017847  
**Bijlagen**  
2

Datum 26 januari 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 26 januari 2017  
Vervaldatum: 25 februari 2017  
Factuurnummer: 170847  
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

| Omschrijving   | Bedrag   |
|--|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD115002017847 | € 1035,- |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002017847  
**Bijlagen**  
2

Datum 26 januari 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 26 januari 2017  
Vervaldatum: 25 februari 2017  
Factuurnummer: 170847  
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

| Omschrijving   | Bedrag |
|--|--------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD115002017847 | €      |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2016.II.550.021
2. Titel van het project : Preventie van pengatinfecties bij gewrichtsdistractie als behandeling van knieartrose
3. Titel van de NTS : Preventie van pengatinfecties bij gewrichtsdistractie als behandeling van knieartrose

## 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: 09-09-2016
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 21-09-2016 en 24-10-2016
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 26-09-2016/12-10-2016 en 31-10-2016/10-01-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 11-01-2017

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

## 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 24-10-2016
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5 leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijk onderzoeker en overige betrokken onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
  - Hoe weet de onderzoeker of de infectie door een huidbacterie komt of door de agens die wordt aangebracht? Onderzoeker geeft aan dat het voor het experiment eigenlijk niet relevant is. Het gaat erom dat zij kunnen aantonen dat zich een infectie ontwikkelt en dat zij er iets aan kunnen doen. De voorkeur gaat uit naar een infectie bij alle dieren van dezelfde stam. Het geeft wel extra informatie als de onderzoeker kan zeggen welke

bacterie de infectie veroorzaakt heeft. De keuze voor de bacterie is nog niet gemaakt. Het zal in ieder geval een bekende stam zijn, welke geselecteerd zal worden met behulp van de afdeling microbiologie. Waarschijnlijk zal de meest [REDACTED] worden. De keuze voor de stam en de criteria waarop deze keuze berust dienen te worden opgenomen in het projectvoorstel.

- De schapen komen van XXX, dat zijn Texelaars, geen melkschapen. De DEC vraagt zich ook af wat de belasting is voor de schapen? Onderzoeker geeft aan dat zij nog geen ervaring hebben met schapen, wel met honden. Van honden is bekend dat zij niet veel last hebben gehad en de verwachting is dat het schaap dat ook niet zal hebben. De meeste last zullen ze van de [REDACTED] hebben. De reden van de keuze voor het schaap is omdat het een rustig dier is, het goedkoper is dan de hond en gebruik van de hond maatschappelijk gevoeliger ligt.
  - Bijlage 1, figuur 2: Het is de DEC niet helder waarom in fase I [REDACTED] wordt gebruikt en in fase II [REDACTED] [REDACTED] A is een in vitro conditie en komt uit de literatuur. Hiermee is in vitro reeds aangetoond dat de resultaten vergelijkbaar zijn. Wat is precies de vervolgfase? Dat ligt aan de resultaten van het voorliggende project. Als er geen goede resultaten zijn dan gaat men misschien wel helemaal opnieuw beginnen en andere aspecten bekijken. Maar het kan ook zijn dat er sterke aanwijzingen zijn dat bepaalde condities heel effectief zijn en dat een wijziging of vervolg project geschreven zal worden. Veel is nog onduidelijk.
  - Wat wordt met de term [REDACTED] bedoeld?  
Binnen een [REDACTED] laten plaatsvinden, dan is het [REDACTED] Gekozen is voor een [REDACTED] om beide [REDACTED] te geven en is ook het [REDACTED] hetzelfde. De [REDACTED] van het [REDACTED], een kleine afbeelding hiervan zou verhelderend werken.
  - Waarom is dit onderzoek niet eerder uitgevoerd n.a.v. de positieve publicatie in 2007? Dat is voor de onderzoekers onbekend. De oorspronkelijke onderzoeker is niet traceerbaar en de overige leden hebben geen behoefte om in contact te treden. Er is gezocht naar unpublished data, maar niet gevonden. In vitro data ondersteunen de eerdere resultaten. Het is verstandig dit in de aanvraag op te nemen, zodat het tijdsgat verantwoord wordt.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 26-09-2016
- Datum antwoord: 12-10-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

### Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af of dit onderzoek niet direct in mensen uitgevoerd kan worden. De meerwaarde van dit onderzoek waarbij proefdieren gebruikt worden is de DEC namelijk niet helder. Graag toelichten.

*De meerwaarde van een onderzoek waarbij proefdieren worden gebruikt boven het uitvoeren van een onderzoek direct op mensen, hebben wij beschreven in de laatste 3 alinea's van 3.1. Het exacte werkingsmechanisme van stroom op pengatinfecties is onbekend, waardoor de effecten voor een klinisch relevant [REDACTED] bij de gewrichtsdistractie behandeling niet kunnen worden voorzien op basis van de eerder door Van der Borden uitgevoerde geitenstudie, waarin de methode voor een [REDACTED] van slechts [REDACTED] is getest. Daarnaast is het onbekend welke verdere effecten de toepassing van een lage stroom heeft op de weefsels rond de botpen. Eventuele effecten van de methode op [REDACTED] van de botpen in het bot zullen ook worden bestudeerd. Deze aspecten worden binnen dit projectvoorstel wel meegenomen. Graag willen we benadrukken dat de opzet van deze dierenstudie translationeel van aard is, met het primaire doel om de voorgestelde methode [REDACTED] verfijnen tot een veilig en effectieve humane techniek.*

- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af of er sprake is van samenwerking met de kliniek en of de mogelijkheid voor het direct uitvoeren van dit onderzoek in de mens met een clinicus besproken is. Ook vraagt de DEC zich af of het onderzoek wordt uitgevoerd in het kader van werkzaamheid en/of veiligheid en of er industrie bij betrokken is. Graag toelichten en zo nodig ook het DEC-formulier nader invullen.

*De samenwerking met de kliniek staat beschreven in de tweede alinea van 3.2. Zowel klinisch microbiologen als orthopeden uit het UMC Utrecht zijn betrokken bij de totstandkoming van dit project. Door clinici binnen die disciplines is een directe humane toepassing overwogen. Door de onbekende lange termijn effecten en beperkte focus in de eerder gepubliceerde artikelen is dat als onverantwoord beoordeeld, onder meer doordat het onbekend is wat de effecten op de verbinding tussen de botpen en het bot zijn. Het risico van bijvoorbeeld het uitbreken van een botpen uit het bot door het toepassen van de voorgestelde methode moet worden uitgesloten. Als dit humaan gebeurt, kan dit resulteren in ernstige consequenties voor de patiënt. In dit stadium is er geen industrie betrokken, het is een volledig academisch initiatief; dat zal na humane toepassing mogelijk wijzigen om het product daadwerkelijk te valoriseren.*

- 3.1 Achtergrond: U spreekt over een gebrek aan in vitromodellen, maar haalt later toch zaken aan die gebaseerd zijn op eerder uitgevoerd in vitro-onderzoek. Graag verhelderen. Het ontbreekt met name aan in vitromodellen die alle bij pengatinfecties betrokken weefsels meenemen, zoals dat in de laatste alinea van 3.1 is genoemd. Het aangehaalde in vitro-onderzoek richt zich op de effecten van de methode op de [REDACTED] van de [REDACTED]

██████████ betrokken micro-organismen. Het is echter niet bekend, of de methode invloed heeft op de weefsels rond het pengat. Dat complexe milieu waarbij o.a. bot-, spier-, vet-, en huidweefsel betrokken zijn, kan niet voldoende worden weerspiegeld door de bestaande in vitro-modellen. Daar leent een in vivo-model zich beter voor.

- 3.1 Achtergrond: In de laatste zin van de 5e alinea zegt u dat het voorkomen van infecties het comfort voor de patiënt vergroot. Het woord 'comfort' vindt de DEC hier niet op zijn plaats. Dit geldt eveneens voor de NTS. De DEC raadt u aan dit anders te formuleren. *Het behandelen van knieartrose met kniedistractie is belastend voor de patiënt. Dit komt vooral doordat de patiënt belemmerd wordt in zijn dagelijks handelen door het aanwezige distractieframe. De gebruikte botpennen hebben daar een groot aandeel in. Het algemene beeld dat wij als terugkoppeling van onze patiënten ontvangen, laat zien dat patiënten zonder pengatinfecties de dagelijkse handelingen goed kunnen uitvoeren. Patiënten mét pengatinfecties zijn echter veel sterker beperkt. De zinnen waarin van comfort werd gesproken zijn herschreven.*

- 3.2 Doel: Het is de DEC niet duidelijk wat precies in vitro is getest en hoe de methode precies is getest. Dit geldt ook voor het in vitro onderzoek genoemd in 3.4. Graag toelichten.

*Het in vitro-onderzoek dat is uitgevoerd, is gebaseerd op het in vitro werk van Van der Borden et al. De resultaten die door die groep zijn gepubliceerd, werden als indrukwekkend en hoopvol gezien, en er is in eerste instantie getracht om deze resultaten binnen ons eigen pilotonderzoek te repliceren. Het onderzoek omvat het kweken van met pengatinfectie geassocieerde bacteriestam bij ██████████ stroomcondities. Het pilotonderzoek is uitgevoerd met een suspensie van een ██████████ bij respectievelijk ██████████. De suspensie werd blootgesteld aan de stroom ██████████ zoals dat wordt gebruikt voor de botpennen in de kniedistractiebehandeling ██████████. Na ██████████ is de ██████████ in de suspensie gemeten middels ██████████ en is het ██████████ geanalyseerd middels confocale microscopie. De effecten die in het pilot-onderzoek werden waargenomen, waren in lijn met de resultaten zoals die door Van der Borden et al. zijn gepubliceerd. De uitkomsten zijn, samen met de effecten van de door Van der Borden et al. uitgevoerde in vivo-studie (geitenmodel), gebruikt in het definiëren van de condities zoals die in dit project worden onderzocht.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC vraagt zich af of u overwogen heeft om ook een groep met device maar zonder infectie mee te nemen (negatieve controle). Graag toelichten. *Er wordt voor iedere conditie inderdaad een groep met device maar zonder infectie meegenomen. Dit was in 3.4.3 onvoldoende duidelijk en onjuist weergegeven in de bijlage beschrijving dierproeven. Dit is aangepast.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC vraagt zich af waar de genoemde power op gebaseerd is. Graag toelichten.

*Wij nemen aan dat de 80% effectiviteit wordt bedoeld waarop de start van een volgende fase is gebaseerd. De overwegingen hierover zijn verderop\* toegelicht.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC zou graag een illustratie zien om een indruk te krijgen van hoe de pennen in het gewricht zitten, gebaseerd op de referentie van Van der Borden et al. (2007). Dit geeft de DEC een indruk van het mogelijke ongerief. Graag toevoegen. *Een dergelijk figuur is beschikbaar in de bijlage Beschrijving dierproeven, figuur 2. De penplaatsing zoals voorgesteld in dit project, zijn niet op basis van Van der Borden et al. (2007) omdat daar niet specifiek werd gekeken naar de penposities voor de kniedistractiebehandeling. Anders dan in de configuratie zoals die voor kniedistractie wordt gebruikt, is dat er enkele unilateraal pennen worden geplaatst. Dit is niet alleen door de beperktere ruimte aan de mediale zijde, maar ook om het ongerief te verminderen. Eerdere studies met gewrichtsdistractie in de hond (DEC 2007.III.02.029; waarbij dus een volledig frame is geplaatst met pennen mediaal en lateraal op het boven en onderbeen) hebben laten zien dat het ongerief van de pennen beperkt is.*
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC vraagt zich af of de onderzoeker rekening houdt met de reeds op de huid van het schaap voorkomende bacteriën die ook een infectie kunnen veroorzaken. Graag toelichten. *Er is rekening gehouden met de op de huid aanwezige bacteriën bij het schaap. In één van de studiegroepen wordt gekeken naar de effecten van de methode op de weefsels rond de pengaten zonder dat er een infectie wordt geïnduceerd. Dit geeft een beeld van de ontwikkeling van pengatinfecties vanuit de reeds op de huid aanwezige bacteriën. De groepen die met een externe bron van bacteriën worden geïnfecteerd, ontvangen een [REDACTED] waarvan bekend is dat deze bij schapen van nature voorkomt, en [REDACTED] is. Dit is een belangrijk criterium om een [REDACTED] te kunnen [REDACTED]. Door deze methode zo te gebruiken hebben we een betere standardisatie van de ontwikkeling van een pengatinfectie en kunnen we met minder dieren onze vraag beantwoorden. De selectie van de bacteriestam gebeurt in samenwerking met de afdeling klinische microbiologie.*
- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.1: U noemt dat meer dan de helft van de dieren een infectie ontwikkelt, terwijl in 3.1 wordt gesproken over 59-85%. Dit is beduidend meer dan de helft, dus hier is een herformulering op zijn plaats. Graag aanpassen. *De in 3.1 genoemde percentages (59-85%) hebben betrekking op humane patiënten die met kniedistractie zijn behandeld. Dit betreft dus andere waarden. We hebben dit in de tekst verhelderd.*
- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.2: De DEC verzoekt u de zin 'voor alle botpennen...femur en tibia).' anders te formuleren, omdat deze zo niet begrijpelijk is. *Deze zin is nu geformuleerd als: Het elektrisch signaal wordt per dier gelijk gekozen voor [REDACTED]. Daarmee worden eventuele verschillen in [REDACTED] effecten meegenomen [REDACTED].*
- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.3: Het is de DEC niet duidelijk waarom er in vervolgfases geen controlegroep meer meegenomen zal worden. Graag toelichten. *In de vervolgfases zal geen positieve controlegroep worden meegenomen. Deze groep is in de eerste fase gekozen om aan te tonen dat er bij infectie met de gekozen bacteriestam een*

*pengatinfectie ontwikkeld. Wanneer die keuze is bevestigd, dan zal die controle in de vervolgfases niet worden gedaan. Daardoor zal ook het aantal benodigde dieren en het ongerief worden beperkt.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.3: De DEC vraagt zich af waar de genoemde <80% effectiviteit op berust, graag toelichten.  
*\* De effectiviteit van 80% zoals die in 3.4.3 is beschreven, is "een educated guess". Daarin is meegewogen dat een hoge effectiviteit nodig is om deze klinisch relevant te maken. Daarnaast is er in de in vivo-studie (geitenmodel) een zeer hoge effectiviteit beschreven. De wijzigingen in het wondverzorgingsprotocol die wij hebben gemaakt voor onze kniedistractie-patiënten, hebben een reductie van pengatinfecties-incidentie opgeleverd van 88% naar 55% van de patiënten. De toepassing van deze methode zal een sterkere reductie moeten geven om rendabel te zijn. Wanneer deze effectiviteit niet wordt gehaald, maar er aanwijzingen zijn dat deze wel kan worden gehaald door bijvoorbeeld het wijzigen van de stroomcondities, dan zal worden overwogen om dit project uit te breiden. Op basis van het reeds gepubliceerde werk, wordt daar vooralsnog niet vanuit gegaan.*
- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.3: De DEC verzoekt u de go/no go-momenten duidelijker te beschrijven.  
*De go/no-go momenten zijn gebaseerd op de effectiviteit van de gekozen elektrische signalen in de verschillende groepen. Wanneer deze effectiviteit niet wordt gehaald, zal worden geconcludeerd dat toepassing van de methode onder andere condities te complex en niet rendabel is. Dit is inzichtelijk gemaakt in figuur 3 van het projectvoorstel.*
- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.3: De DEC verzoekt u de proefopzet in zijn geheel uitgebreider toe te lichten, waarbij ook de informatie met betrekking tot [REDACTED] en dergelijke wordt verduidelijkt. Zo vraagt de DEC zich bijvoorbeeld af hoe u bijvoorbeeld de [REDACTED] van het elektrisch signaal [REDACTED]. Dit is momenteel niet navolgbaar, hetgeen absoluut vereiste is voor het maken van een ethische afweging. Graag toelichten.  
*De proefopzet is uitgebreid en de [REDACTED] in het elektrisch signaal per studiegroep is beschreven.*

#### Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u de genoemde fases te definiëren. Dit geldt ook voor kopje 'B. De dieren'.  
*De projectfases zijn inzichtelijk gemaakt in figuur 2 van de bijlage.*
- B. De dieren: De DEC heeft het idee dat u gewone schapen bedoelt in plaats van melkschapen, omdat laatstgenoemde niet veel voorkomen in Nederland en bovendien beweeglijker zijn dan gewone schapen. Graag toelichten en eventueel aanpassen. Tevens dient u ook in de bijlage aan te geven dat voor het schaap gekozen wordt (in plaats van de geit) omdat een schaap minder beweeglijk is. Dit wordt nu alleen in de NTS genoemd.  
*De schapen die wij voor ons onderzoek willen gebruiken, zijn in overleg gekozen met een dierenarts binnen het gezamenlijk dierenlaboratorium waar deze studie zal plaatsvinden.*



*De schapen zijn beschikbaar vanuit een dicht bij het laboratorium gelegen bedrijf. Het is echter zo dat gewone schapen voor dit onderzoek ook gebruikt kunnen worden, en de keuze is vooral gebaseerd op de gunstige logistieke mogelijkheden. De keuze voor het schaap op basis de beweeglijkheid zal in de aanvraag worden toegelicht zoals dat ook in de NTS is opgenomen.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum vragen: 31-10-2016 (n.a.v. gesprek)

- Datum antwoord: 09-01-2017

- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- Algemeen: De DEC raadt u aan duidelijk in de aanvraag te vermelden wat bedoeld wordt met vervolgfase, zodat eventuele verwarring voorkomen wordt.

*Dit is opgenomen in het projectvoorstel.*

- 3.1 Achtergrond: De DEC raadt u aan in de aanvraag op te nemen dat u heeft geprobeerd met de onderzoeker van de publicatie in 2007 in contact te komen en dat u heeft gezocht naar unpublished data.

*Dit is opgenomen in het projectvoorstel.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Tevens verzoekt de DEC u in de aanvraag de keuze voor het gebruik van de bacteriestam te onderbouwen en de criteria te noemen waarop deze keuze berust. Ook graag benoemen of en hoe u onderscheid maakt tussen de huidbacterie en het aangebrachte agens.

*Dit is opgenomen in het projectvoorstel.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Graag kort uitleggen, met behulp van een kleine tekening, wat wordt bedoeld met XXXXXXXXXX

*Er is een figuur opgenomen in het projectvoorstel.*

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

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

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

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

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het project is gericht op het onderzoeken van de werkzaamheid en belasting van een nieuwe behandeling voor penguinfecties, een infectie die kan optreden als gevolg van gewrichtsdistractie van de knie. Het uitvoeren van een gewrichtsdistractie is een gewricht besparende ingreep bij patiënten met een artrose van de knie. De gewrichtsdistractie wordt uitgevoerd met pennen die in het bot bevestigd worden. Een veel voorkomende complicatie (59-85%) is het optreden van infecties op de plaats waar de botpennen door de huid heen steken. Met antibiotica is een goede behandeling van de infectie mogelijk, maar de toenemende problematiek met de ontwikkeling van antibiotica resistente micro-organismen vraagt om een andere aanpak. In 2007 zijn door een andere onderzoeksgroep in vitro studies en een in vivo geitenstudie uitgevoerd, waarbij een klinisch relevante vermindering van infecties werd aangetoond door het toebrengen van een lage hoeveelheid elektrische stroom op de botpennen. De uitgevoerde studies laten echter een aantal aspecten onderbelicht die voor een eventuele humane toepassing bij behandeling van artrose van de knie d.m.v. distractie verder onderzoek vereisen. Een van deze aspecten is de beperkte duur van de behandeling in de studie uit 2007, waardoor het onbekend is welk effect kan worden verwacht wanneer deze voor de gehele duur van de kniedistractie ( ) wordt toegepast. Daarnaast is onbekend welke verdere effecten het toebrengen van een lage hoeveelheid stroom heeft op de weefsels rond de botpennen en wat de effecten zijn op de verbinding van de botpen in het bot. Met behulp van het voorliggende project wil de aanvrager daarom in schapen onderzoeken of, , penguinfecties voorkomen kunnen worden door het toebrengen van een lage hoeveelheid elektrische stroom op de botpennen en het effect hiervan op de omliggende weke delen en de veiligheid van de methode bepalen. Met het oog op toenemende antibiotica resistentie en de goede behandelresultaten met de gewrichtsdistractie, onderschrijft de DEC het belang van deze doelstelling. Met behulp van een schapenmodel wordt, na het aanbrengen van de potbennen en na het al dan niet induceren van een infectie met een , het effect van het elektrische signaal bepaald. Bij een effect van <20% (go/no-go moment) wordt een hoger elektrisch signaal gebruikt. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen is helder en vergelijkbaar met voorbeeld 3 uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project'.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is het bepalen van de effectiviteit van het gebruik van elektrische stroom bij pengatontstekingen, welke zijn ontstaan als gevolg van externe fixatie van het kniegewricht d.m.v. botpennen. Het uiteindelijke doel van het project is een klinisch relevante toepassing ontwikkelen zodat het aantal penguinfecties, als gevolg van externe

fixatie, bij patiënten gereduceerd kan worden. Voordat elektrische stroom als klinische interventie gebruikt kan worden is het van belang de effectiviteit hiervan te testen voor een [REDACTED] en of dit geschiedt zonder bijeffecten die een veilige toepassing verhinderen. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de onderzoekers, de patiënten en in bepaalde mate ook de samenleving.  
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en als gevolg van de experimenten zullen de dieren stress en pijn ondervinden. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.  
Voor de onderzoekers geldt dat het ontwikkelen van deze nieuwe techniek bijdraagt aan een goede wetenschappelijke reputatie. Wetenschappelijke reputatie kunnen door de onderzoeker van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC Utrecht geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.  
Door pengatinfecties te voorkomen zal de patiënt pijn en ongemak bespaard blijven. Ook het gebruik van antibiotica blijft de patiënt bespaard, wat ten goede komt aan zijn/haar gezondheid. Daarnaast geeft deze methode de patiënt de beschikbaarheid tot een alternatieve therapie.  
De toenemende problematiek met de ontwikkeling van antibiotica resistente micro-organismen vraagt om nieuwe methoden om de ontwikkeling van infecties te voorkomen en behandeling met antibiotica te beperken tot een minimum. Dit heeft niet alleen gevolgen voor de gezondheid van de patiënt, maar ook voor de volksgezondheid.
6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Gewrichtsdistractie als behandeloptie voor patiënten met artrose van de knie, is ontwikkeld vanuit een langdurige samenwerking tussen de afdelingen Orthopedie en Reumatologie en ook bij de totstandkoming van dit project zijn deze afdelingen betrokken. De selectie van de bacteriestam gebeurt in samenwerking met de afdeling Medische Microbiologie. Op basis van deze samenwerkingen en op basis van de positieve resultaten van eigen in vitro onderzoek, gebaseerd op de publicatie uit 2007, gaat de DEC ervan uit dat het een haalbaar project is.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het

project. In een schapenmodel zullen onder anesthesie botpennen worden geplaatst. Direct na het plaatsen van de [REDACTED] welke [REDACTED], zullen de pengaten al dan niet worden geïnfecteerd met een [REDACTED]. Tussen iedere [REDACTED] wordt vervolgens een [REDACTED], dat een elektrisch signaal afgeeft. De configuratie van de botpennen is gebaseerd op de humane kniedistractiebehandeling. De pennen in dit project zullen echter aan de buitenzijde van de poot worden geplaatst (unilateraal), en niet bilateraal zoals dat humaan gebeurt, omdat er aan de binnenzijde minder ruimte is en omdat het minder ongerief geeft. Het aantal infecties dat zich ontwikkelt in de [REDACTED] is de primaire uitkomstparameter. De secundaire uitkomstparameters zijn: de tijd in dagen tot het ontwikkelen van een gradatie 2 en 3 infectie, histologie van de weefsels (bot en weke delen) rond de pengaten na terminatie en beeldvorming van de bot-botpen verbinding met röntgenfoto's en microCT. De fasering in de uitvoering en de go/no-go momenten zijn met behulp van een figuur helder uiteengezet.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt voor alle dieren ingeschat als matig, hoofdzakelijk als gevolg van het onder anesthesie plaatsen van de botpennen in het bovenbeen en onderbeen en het eventueel ontwikkelen van één of meerdere pengatinfecties. Wanneer de infectie gradatie 3 bereikt zal het dier behandeld worden met antibiotica, de wond worden gereinigd en, indien nodig, pijnstilling worden toegediend. Om de werkelijke belasting voor het schaap en het verloop van het ongerief vast te stellen, raadt de DEC aan de IvD bij de start van het experiment, wanneer de mogelijke pengatinfectie ontstaat, toezicht te laten houden.
12. De integriteit van de dieren wordt in fysiek opzicht aangetast. Als gevolg van de chirurgische ingreep zullen de dieren pijn ervaren (fysieke aantasting). Door de botpennen, waardoor een

tijdelijk verminderde mobiliteit optreedt, en het eventueel ontstaan van één of meer infecties worden de dieren eveneens fysiek aangetast.

13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Men houdt er rekening mee dat minder dan 10% van de dieren het humane eindpunt bereikt ten gevolge van ernstige verwondingen door trauma, een blijvende ontsteking in de 3<sup>e</sup> graad (ook na behandeling met antibiotica), blijvend sterk verminderde mobiliteit, het ontstaan van meer dan matig ongerief als gevolg van de operatie of ernstige verwondingen door trauma en fracturen door een ernstige botinfectie.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voorafgaand aan dit onderzoek heeft *in vitro* onderzoek plaats gevonden om het gebruik van elektrische stroom als preventiemethode voor pengatinfecties te optimaliseren. Maar de nog op te helderen effecten op betrokken weefsels (huid, weke delen en bot) en de langetermijneffecten van deze methode zijn niet *in vitro* of *in silico* na te bootsen. Daarnaast zal, ondanks de zeer goede *in vitro* resultaten, de effectiviteit ook *in vivo* moeten worden bevestigd voordat het humaan toegepast mag worden.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren worden statistische methoden toegepast en er heeft overleg met een biostatisticus plaats gevonden. Onnodig proefdiergebruik wordt voorkomen met behulp van heldere go/no-go momenten.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. In dit project wordt er gestuurd op optimalisatie van de preventiemethode om humane toepassing mogelijk te maken. Dit vereist een diersoort die qua anatomie zo dicht mogelijk bij de mens staat. Om de kans op kruisbesmetting en op beschadiging van de botpennen te beperken is het van belang een diersoort te kiezen met een beperkte fysieke activiteit. Om deze redenen is gekozen voor het schaap. De botpennen zullen overigens zo goed mogelijk worden afgeschermd om beschadiging te voorkomen. Wanneer een dier een pengatinfectie ontwikkelt, zal het, in overleg met de betrokken dierenarts, worden behandeld met antibiotica wanneer deze gradatie 3 bereikt volgens de scoringmethode die als primaire uitkomstmaat wordt gebruikt. In dat geval zal het geïnfecteerde pengat voor de duur van de antibioticakuur dagelijks worden gereinigd. Daarnaast zal pijnstilling worden gegeven wanneer dat nodig wordt geacht.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

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

18. Dieren van beide geslachten zullen, afhankelijk van de beschikbaarheid, in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood om post mortem histologie te verrichten op de betrokken weefsels (huid, weke delen en bot) ten behoeve van onderzoek van de [REDACTED] van de toegepaste methode. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel schapen voor wetenschappelijke redenen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

*NTS*

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

**D. Ethische afweging**

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het directe doel van het project (het bepalen van de effectiviteit van het gebruik van elektrische stroom bij pengatontstekingen welke zijn ontstaan als gevolg van externe fixatie) en het uiteindelijke doel (een klinisch relevante toepassing ontwikkelen zodat het aantal pengatinfecties, als gevolg van externe fixatie, bij patiënten gereduceerd kan worden), gezien de hoge waarschijnlijkheid dat de doelstellingen behaald zullen worden, het matige ongerief dat dieren wordt aangedaan in het voorliggende project?
2. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel. Waarden die voor onderzoekers worden bevorderd: gering voordeel. Waarden die voor de patiënt worden bevorderd: veel voordeel. Waarden die voor de samenleving worden bevorderd: matig tot veel voordeel. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project bijdragen aan de preventie van pengatontstekingen, welke kunnen ontstaan door het aanbrengen van een gewrichtsdistractie ter behandeling van knieartrose. De doelgroep, maar ook de samenleving zou er zeer bij gebaat zijn als op deze wijze de pengatinfecties voorkomen kunnen worden, zonder de inzet van antibiotica. De DEC is derhalve van mening dat de belangen van de patiënt en de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Het feit dat de waarden voor de onderzoekers door dit project worden bevorderd speelde voor de DEC bij het maken van de ethische afweging geen rol van betekenis. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen er alles aan om ongerief voor de dieren tot een minimum te beperken.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling: het bepalen van de effectiviteit van het gebruik van elektrische stroom bij pengatontstekingen, welke zijn ontstaan als gevolg van externe fixatie, met als uiteindelijke doel een klinisch relevante toepassing ontwikkelen dat pengatinfecties, als gevolg van externe fixatie, bij patiënten voorkomt. De DEC is van mening dat de waarden die voor de patiënten en de volksgezondheid bevorderd kunnen worden opwegen tegen de belangen van de proefdieren om gevrijwaard te blijven van aantasting van hun welzijn en integriteit. De DEC is ook van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Door de stapsgewijze opzet en heldere go/no-go momenten wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstellingen opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren zullen ondervinden, en dat de doelstellingen het gebruik van proefdieren rechtvaardigen.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

De DEC raadt de CCD aan om als voorwaarde te stellen, dat de IvD betrokken wordt bij het inschatten van het werkelijke ongerief door het aanbrengen van de botpennen en de mogelijke effecten van de infectie.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002017847  
**Bijlagen**  
1

Datum 20 februari 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 25 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preventie van pengatinfecties bij gewrichtsdistractie als behandeling van knieartrose" met aanvraagnummer AVD115002017847. 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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld. De voorwaarde betreffend het inschatten van de ongeriefclassificatie wordt gesteld op advies van de DEC, omdat dit model nog niet eerder in het schaap is uitgevoerd.

U kunt met uw project "Preventie van pengatinfecties bij gewrichtsdistractie als behandeling van knieartrose" starten. De vergunning wordt afgegeven van 21 februari 2017 tot en met 1 februari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 11 januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden



aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
20 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD115002017847

#### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven

namens de

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: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 21 februari 2017 tot en met 1 februari 2022, voor het project "Preventie van pengatinfecties bij gewrichtsdistractie als behandeling van knieartrose" met aanvraagnummer AVD115002017847, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 januari 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 januari 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 11 januari 2017, ontvangen op 25 januari 2017.

| Naam proef   | Diersoort/ Stam                                   | Aantal dieren | Ernst      | Opmerkingen |
|--|---|---------------|------------|-------------|
| <b>3.4.4.1 Schaaamodel – Preventie van pengatinfectie met een elektrisch signaal</b> |   |               |            |             |
|  | Schapen ( <i>Ovis aries</i> ) / volwassen schapen | 85            | 100% Matig |             |

### Voorwaarden

*Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen*

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van

**Aanvraagnummer:**  
AVD115002017847

het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

De IvD wordt betrokken bij het inschatten van het werkelijk geleden ongerief door het aanbrengen van de botpennen en de mogelijke effecten van de infectie.



**Aanvraagnummer:**

AVD115002017847

## 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

**Aanvraagnummer:**  
AVD115002017847

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.

| <b>Inventaris Wob-verzoek W17-07</b> |                             |                        |             |               |              |                          |               |               |             |   |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------|-------------|---|
|                                      |                             | <b>wordt verstrekt</b> |             |               |              | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |             |   |
| <b>nr.</b>                           | <b>document NTS 2017850</b> | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b> | <b>10.1.c</b>            | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |   |
| 1                                    | Aanvraagformulier           |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 2                                    | NTS initieel                | x                      |             |               |              |                          |               |               |             |   |
| 3                                    | Project proposal            |                        |             |               | x            |                          |               | x             |             |   |
| 4                                    | bijlage dierproeven 1       |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 5                                    | bijlage dierproeven 2       |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 6                                    | bijlage dierproeven 3       |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 7                                    | DEC advies                  |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 8                                    | mail startdatum             |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 9                                    | Advies CCD aan bestuur      |                        | x           |               |              |                          |               |               |             | x |
| 10                                   | Beschikking                 |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 11                                   | aangepaste beschikking      |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |

AVD 11402 2017 052



06 FEB. 2017

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

|   |   |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
|---|---|---|--------------------------------|--|--|---|------------|--|------------|------------|--|----------------------|--------------|------|-------------|------------|--|--------------------|--------|-----------|------|--|--|---------------------------------------|--|--|
| 1.1   | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   11400<br><input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen  |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| 1.2   | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | <table border="1"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>64156338</td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>de Boelelaan</td><td>1117</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>1081HV</td><td>Amsterdam</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2"></td></tr></table> | Naam instelling of organisatie | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam |  | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted] |  | KvK-nummer | 64156338   |  | Straat en huisnummer | de Boelelaan | 1117 | Postbus     |            |  | Postcode en plaats | 1081HV | Amsterdam | IBAN |  |  | Tenaamstelling van het rekeningnummer |  |  |
| Naam instelling of organisatie                      | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam  |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted]  |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| KvK-nummer  | 64156338  |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| Straat en huisnummer                                | de Boelelaan  | 1117  |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| Postbus   |   |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| Postcode en plaats                                  | 1081HV  | Amsterdam   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| IBAN  |   |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               |   |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| 1.3   | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | <table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>   | (Titel) Naam en voorletters    | [Redacted]   | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie   | [Redacted] |  | Afdeling   | [Redacted] |  | Telefoonnummer       | [Redacted]   |      | E-mailadres | [Redacted] |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| (Titel) Naam en voorletters                         | [Redacted]  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.  |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| Functie   | [Redacted]  |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| Afdeling  | [Redacted]  |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| Telefoonnummer                                      | [Redacted]  |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| E-mailadres   | [Redacted]  |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| 1.4   | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  |   |                                |  |  |   |            |  |            |            |  |                      |              |      |             |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| 1.5   | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | <table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>   | (Titel) Naam en voorletters    |  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie   |            |  | Afdeling   |            |  | Telefoonnummer       |              |      | E-mailadres |            |  |                    |        |           |      |  |  |                                       |  |  |
| (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 | 01-06-2017 |
| Einddatum  | 01-06-2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam) cellen
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam) cellen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |   |
|-------------|---|
| Naam DEC    | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| Postadres   | Amsterdam   Nederland                       |
| E-mailadres |   |



## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 Lege

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

Via een eenmalige incasso

*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.*

X Na ontvangst van de factuur\*

\* Wanneer factuur direct naar financiële afdeling VUmc dient te gaan hier een inkoopordernummer en factuuradres, graag van te voren afstemmen met financiële afdeling.

Inkoopordernummer: [REDACTED]

Factuuradres: Afdeling crediteuren, VU Medisch Centrum, p/a [REDACTED]

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Amsterdam

Datum 31 - 01 - 2017

Handtekening [REDACTED]



## Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).

### 1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- |                                |            |
|--------------------------------|------------|
| Naam van de portefeuillehouder | [REDACTED] |
| KvK-nummer                     | 64156338   |
| NVWA deelnemernummer           | 11400      |

### 2 Gegevens gemachtigde

- 2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN)  
Geef aan welk nummer u invult.
- |   |            |
|---|------------|
| <input type="checkbox"/> KvK-nummer     | [REDACTED] |
| <input checked="" type="checkbox"/> BSN | [REDACTED] |
- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?
- |                    |                      |   |
|--------------------|----------------------|---|
| Naam gemachtigde   | [REDACTED]           | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Adres of postbus   | [REDACTED]           |   |
| Postcode en Plaats | [REDACTED] Amsterdam |   |

### 3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?  Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.  
 Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken?  Ja > Ga door naar vraag 4  
 Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u 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

### 4 Ondertekening

- 4.1 Onderteken het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Naam gemachtigde

Datum

1 6 - 0 8 - 2 0 1 6

Handtekening  
portefeuillehouder  
van de instelling

Handtekening  
gemachtigde



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

**Leukemie** is kanker van het bloed en het beenmerg en kan chronisch zijn of acuut en in dat laatste geval is een snelle behandeling nodig. **Acute myeloïde leukemie (AML)** wordt gekenmerkt door een overproductie van onrijpe witte bloedcellen. Elk jaar krijgen in Nederland ongeveer 600 mensen AML. De ziekte kan zich op elke leeftijd openbaren, maar komt vaker voor bij volwassenen in de leeftijd boven de 60 jaar. Er worden verschillende subtypes van AML onderscheiden. Elk subtype zegt iets over het type bloedcellen dat betrokken is bij de vorming van de leukemie en het stadium waarin de leukemiecellen geblokkeerd zijn in hun rijping. Informatie over het AML subtype van de patiënt biedt inzicht in het vooruitzicht (de prognose), van de patiënt en de beste manier om de patiënt te behandelen.

**De standaardbehandeling** van AML patiënten bestaat uit twee chemotherapie kuren die als doel hebben om de leukemie cellen te vernietigen en een complete remissie te induceren. Complete remissie is bereikt als er geen leukemie cellen in het bloed en beenmerg meer kunnen worden aangetoond met microscopisch onderzoek en als er een herstel van het aantal normale gezonde bloedcellen is bereikt. Na het bereiken van een complete remissie wordt, afhankelijk van het leukemie subtype, aanvullende therapie gegeven in de vorm van een derde chemotherapie kuur of een stamceltransplantatie. Dit om de kans op terugkeer van de leukemie te verminderen. Ondanks hoge complete remissie percentages leeft nog maar 30-40% (<60 jaar) en 10-20% (>60 jaar) van de AML patiënten vijf jaar na de diagnose. Deze extreem slechte uitkomst wordt voornamelijk veroorzaakt door overleving van een klein aantal leukemie cellen na chemotherapie (minimale restziekte) die in een slaaptoestand verkeren maar op een bepaald moment gaan uitgroeien en het recidief (terugkeer) veroorzaken. Patiënten met een AML recidief hebben een gemiddelde overleving van minder dan 6 maanden en voor de meeste van deze patiënten is op dit moment geen effectieve behandeling beschikbaar.

Een van de subtypes van AML, **acute promyelocytenleukemie (APL)**, wordt niet met chemotherapie behandeld maar met all trans retinoic acid (ATRA) differentiatie therapie. APL leukemie cellen bevatten een fusie van twee chromosomen waardoor het eiwit PML-RARA aanwezig is. De aanwezigheid van dit eiwit maakt dat APL cellen goed reageren op de behandeling met ATRA. De ontdekking dat APL patiënten zeer succesvol behandeld kunnen worden met ATRA heeft er toe geleid dat APL van een fatale ziekte veranderd is in een ziekte die voor meer dan 90% van de patiënten te genezen is.

Bij diagnose is AML een heterogene populatie van leukemie cellen waarbij na de selectieve druk van de chemotherapie behandeling meestal een kleine hoeveelheid cellen blijft leven. Deze kleine chemotherapie ongevoelige subpopulatie van leukemie cellen kan vervolgens het recidief veroorzaken. Het is vaak zo dat het leukemie recidief ontstaat vanuit een kleine hoeveelheid leukemie cellen die niet zichtbaar zijn bij de diagnose van de ziekte. Dit zijn vaak leukemie cellen met stamcel kenmerken, zogenaamde leukemische stam cellen (LSCs). Om de overlevingskansen van leukemie patiënten te vergroten is het nodig om therapeutische strategieën te ontdekken en te ontwikkelen die deze chemotherapie ongevoelige AML cellen doden. LSCs zitten samen met normale gezonde stamcellen, de hematopoïetische stamcellen, in het beenmerg van de AML patiënt. Deze gezonde stamcellen groeien na therapie weer uit tot gezonde bloedcellen. Een succesvolle therapie die de LSCs elimineert zal de gezonde stamcellen moeten sparen zodat de patiënt na de therapie weer gezonde bloedcellen kan aanmaken. Hiervoor moeten we de leukemie cellen met stamcel eigenschappen karakteriseren en een beter inzicht krijgen in de kenmerken van deze cellen in elke AML patiënt. De effectiviteit en toxiciteit van nieuw ontdekte **therapieën** zal na het testen in een reageerbuis (*in vitro*) in het laboratorium, getest moeten worden in een diermodel voordat het toegepast kan worden in de patiënt.

Een van de mogelijkheden om genen geassocieerd met stamcel eigenschappen te identificeren en/of een therapie te ontwikkelen tegen LSCs waarbij gezonde stamcellen gespaard blijven is het bepalen van de differentiële expressie van genen in verschillende cel populaties. Door middel van gen expressie profilering hebben we in het verleden genen (inclusief microRNAs) geïdentificeerd die verschillend aanwezig zijn in verschillende (stam)cel populaties. De door ons geïdentificeerde genen zullen we bestuderen voor hun rol in de overleving en gevoeligheid voor therapie van leukemie cellen. Vervolgens zullen deze genen bekeken worden op hun effectiviteit als therapie doelwitten en zullen aanwezige remmers van deze genen/signaal paden, zoals nieuwe cytostatica, op genen gerichte ("targeted") therapie, chemotherapie, differentiatie therapie, "small molecules" tegen signaal moleculen, immuun therapie en recombinante eiwitten getest worden in monotherapie of in combinatie voor hun effectiviteit om leukemie cellen te doden en de gezonde cellen in leven te houden.

**Chronische myeloïde leukemie (CML)** begint met een chronische fase maar wanneer de patiënt niet goed

reageert op een behandeling ontstaat na verloop van tijd (meestal enkele jaren) een acute fase waarbij de uitrijping van de witte bloedcellen nog meer verstoord raakt en er in het bloed en beenmerg afwijkende cellen aanwezig zijn die de normale bloedcelproductie belemmeren. Dit leidt binnen enkele maanden tot de dood door infecties, bloedingen en ernstige bloedarmoede. In Nederland komen er per jaar 200-250 patiënten met CML bij. Bij de meeste patiënten wordt een genetische afwijking gevonden: het Philadelphia chromosoom. Dit chromosoom leidt tot productie van een eiwit (BCR-ABL) dat verantwoordelijk is voor het ontstaan van de leukemie. Sinds 10 jaar zijn er effectieve geneesmiddelen, gericht tegen het Philadelphia chromosoom, beschikbaar voor patiënten met CML. Het levenslange gebruik van deze medicijnen geeft veel bijwerkingen maar is nodig om te voorkomen dat de ziekte terug komt. De terugkeer van CML wordt, net als bij patiënten met AML, veroorzaakt door een kleine hoeveelheid leukemie cellen, LSCs, die in leven blijven na de behandeling. Deze LSCs kunnen maanden of jaren later wakker worden en de leukemie opnieuw aanwakken. Optimale therapie tegen CML moet dus ook deze LSCs uitroeien. Om therapie strategieën te ontwikkelen tegen LSCs moeten we deze cellen karakteriseren en een beter inzicht krijgen in hun kenmerken. Vervolgens is het nodig om specifieke therapieën te ontwikkelen tegen deze leukemie (stam) cellen. De effectiviteit en toxiciteit van deze nieuwe therapieën, in monotherapie of als combinatie te gebruiken, zal na het testen *in vitro*, getest moeten worden in een diermodel.

### **Het diermodel**

Diermodellen worden gebruikt om, na het intensief testen van het geneesmiddel in het laboratorium *in vitro*, de effectiviteit van het medicijn *in vivo* te evalueren. De ontwikkeling van immunodeficiëntie muizen heeft geleid tot de mogelijkheid om geneesmiddelen tegen leukemie *in vivo* te analyseren en de effectiviteit en toxiciteit van behandelingen gericht tegen humane leukemie cellen te bepalen. Het NOD/SCID/IL2 gamma chain (NSG) knock-out muizenmodel is op het moment het meest geaccepteerde en gebruikte model om *in vivo* de aanwezigheid van normale of leukemische (stam) cellen na een behandeling vast te stellen. Er worden steeds nieuwe immunodeficiëntie muizenmodellen gemaakt die steeds beter geschikt worden voor het onderzoek naar nieuwe medicijnen tegen leukemie. Er is veel ervaring met het immuundeficiëntie muizenmodel waardoor er geen extra dieren gebruikt hoeven worden om het model te valideren. De verminderde afweer in deze dieren (afwezigheid van T en B cellen en verminderde NK cel activiteit) maakt het mogelijk om in deze dieren humane leukemie te laten uitgroeien en te bestuderen. Ook behouden de uitgegroeide humane kanker cellen in dit model de karakteristieken van de originele leukemie. Het micromilieu van het muizenbeenmerg komt in grote lijnen overeen met het micromilieu in menselijk beenmerg maar toch worden immuun-deficiënte muizenmodellen, waarbij gebruik gemaakt wordt van humane tumor groei in de muis, constant aangepast en geoptimaliseerd om ook de omgeving te humaniseren. De immuun-deficiënte muis (al dan niet aangepast met een menselijk micromilieu) is de basis voor alle experimenten gepland binnen dit project.

In dit project willen we, na het bestuderen van de functie en rol van de door ons ontdekte genen in de reageerbuis (*in vitro*), de rol van deze genen in een immuundeficiënt muizenmodel *in vivo* bestuderen en nieuwe therapieën gericht tegen deze genen testen voor hun effectiviteit in dit muizenmodel. We zullen het effect van de modulatie van genen (inclusief microRNAs) en van behandeling met nieuw ontdekte (bestaande of nieuwe) therapie, inclusief chemotherapie, differentiatie therapie, "targeted" therapie, small molecules tegen signaal moleculen, immuun therapie en recombinante eiwitten, in mono of combinatie therapie bestuderen voor het effect op de vorming van leukemie, de leukemie cel overleving en voor het effect op therapie gevoeligheid. In dit project zullen zowel leukemie cellijnen als leukemie patiënt cellen, al dan niet gemoduleerd in gen expressie, subcutaan, intraveneus of in het beenmerg van de immuun deficiënte muizen injecteren. Vervolgens zullen we na een bepaalde behandeling de uitgroei van leukemie en normale hematopoietische cellen bestuderen. Dit zal aangeven of het moduleren van gen expressie en/of het gebruik van een bepaald geneesmiddel resulteert in het verminderen van de leukemie en tegelijkertijd in het herstellen/sparen van de gezonde bloedcellen.

### **3.2 Doel**

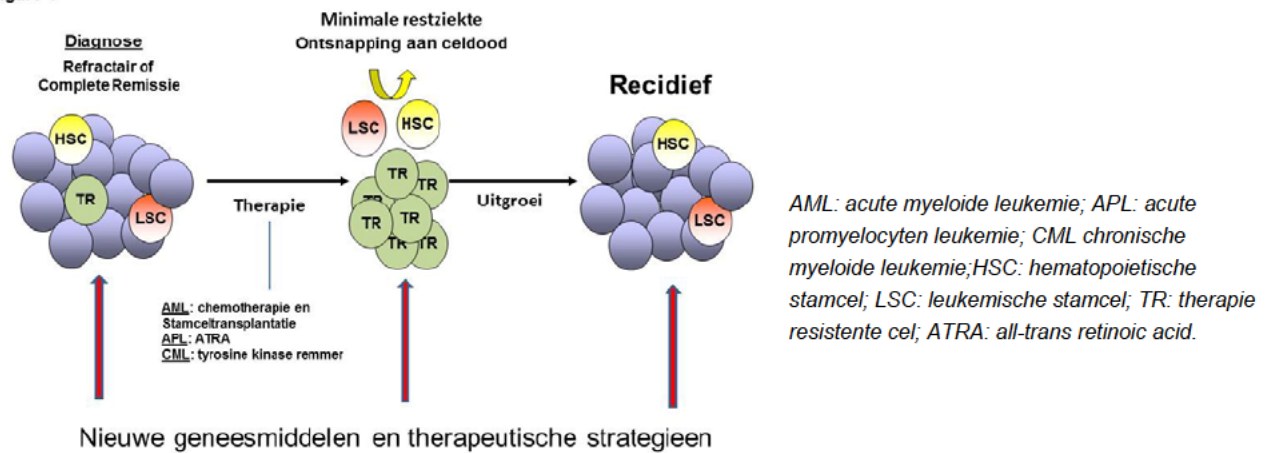
Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- 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 en haalbaarheid van het project.

Het uiteindelijke doel is om een effectief geneesmiddel en/of een effectieve therapeutische strategie te ontwikkelen om leukemie cellen in leukemie patiënten te elimineren en de terugkeer van de leukemie te voorkomen. Deze geneesmiddelen/therapeutische strategieën zullen gericht zijn tegen leukemie cellen die ongevoelig zijn voor de huidige gebruikte therapieën en zullen als mono of combinatie therapie gericht zijn tegen het elimineren van alle leukemie cellen in de patiënt. De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen die leukemie cellen doden zullen bijdragen aan betere overlevingskansen voor leukemie patiënten. Het doel van dit project zal bereikt worden door genen te testen voor hun rol in leukemie initiatie, therapie gevoeligheid, proliferatie, "zelf-vernieuwing", en differentiatie in een immuun deficiënt muis model. Vervolgens zullen we therapieën (chemotherapie, differentiatie therapie, "targeted" therapie, small molecules tegen signaal moleculen, immuun therapie en recombinante eiwitten) gericht tegen deze genen/signalerings routes in mono- of combinatie therapie preklinisch testen voor hun effectiviteit in het doden van leukemie cellen (Figuur 1).

Figure 1



### Specifieke vragen die met behulp van deze dierexperimenten bestudeerd gaan worden:

#### Kenmerk identificatie

Wat zijn kenmerken van de cel die de overleving van cellen tijdens therapie beïnvloeden?

Wat zijn cel kenmerken die leukemie cel differentiatie en zelf-vernieuwing ("stemness") beïnvloeden?

Wat zijn cel kenmerken die leukemie cel proliferatie/quiescence beïnvloeden?

Welke kenmerken (genetisch, epigenetisch en immuunfenotypisch) van de cel en de omgeving beïnvloeden leukemie (re)-initiatie?

#### Therapie identificatie

Welke nieuwe therapieën zijn effectief in het elimineren van (chemotherapie ongevoelige) leukemie cellen bij diagnose, het stadium van minimale restziekte en bij recidief?

Welke therapie is effectief bij welke leukemie patiënt ("personalized" treatment)?

#### Haalbaarheid

De haalbaarheid van dit onderzoek is verzekerd door de volgende punten:

- De afdeling waar dit onderzoek zal plaatsvinden ( ) heeft een grote biobank van leukemie (AML en CML) patiënten monsters (beenmerg en perifeer bloed >1500), die op alle verschillende stadia van de ziekte (diagnose, na chemotherapie en recidief) zijn afgenomen, en wordt bovendien ook constant voorzien van nieuwe patiënten monsters. De ( ) is betrokken bij vele nationale en internationale klinische en onderzoek studies en verkrijgt daardoor vele patiënten monsters om experimenten mee uit te voeren. Van veel patiënten hebben we meer dan 100 miljoen cellen in onze biobank.
- Dit project is een voorzetting van ons eerdere *in vivo* werk in het immuun deficiënte muizen model. Dit eerdere werk heeft voor een collectie van patiënten samples gezorgd waarvan we weten dat deze een hele goede uitgroei (>15%) in de NSG muis geven en waarvan we veel ingevroren cellen hebben (>100 miljoen). Op het moment zijn we bezig om elke leukemie aanwezig in onze biobank (met veel cellen) te

testen voor uitgroei potentie in het immuun deficiënte muizen model. Dit is om er zorg voor te dragen dat we een constante voorraad van monsters hebben voor de in alle projecten lopende experimenten. We hebben gezien dat leukemie-specifieke karakteristieken zoals de aanwezigheid van oppervlakte eiwitten in de meeste gevallen stabiel blijft na injectie (transplantatie) en re-transplantatie in de muis.

- We hebben het AML xenograft NSG muizenmodel opgezet en kunnen na uitgroei in de muis goed de leukemie en de normale cellen van elkaar onderscheiden. Ook hebben we expertise in het injecteren van kleine hoeveelheden leukemie cellen in het beenmerg, de intrabeenmerg injectie, waardoor we zeer kleine opgezuiverde fracties van cellen met succes kunnen inspuiten en laten groeien.
- In het verleden hebben we de *in vivo* uitgroei potentie van AML cellen die *in vitro* gekweekt en getransduceerd zijn met virussen uitvoerig getest en zo geoptimaliseerd dat het kweken en de transductie met virale deeltjes geen invloed heeft op de potentie om in de muis uit te groeien.
- Sinds de huidige therapie voor AML patiënten uit combinatie chemotherapie en/of differentiatie therapie (ATRA voor APL patiënten) bestaat, hebben we toediening van deze beide vormen van therapie geoptimaliseerd in het NSG muizen model.
- De projectgroep omvat ervaren proefdier analisten om het project uit te voeren en [REDACTED] heeft alle technische voorzieningen en instrumentatie (zoals imaging apparatuur) om de experimenten binnen dit protocol uit te voeren.
- Het onderzoek wordt onder andere gefinancierd door [REDACTED]

Deze lopende projecten bevatten de muizen experimenten die de komende 5 jaar uitgevoerd moeten worden.

Recente publicaties met betrekking tot dit project:

### 3.3 Belang

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

#### Wetenschappelijk belang

De resultaten van dit onderzoek zullen een bijdrage leveren aan een beter inzicht in de mechanismes die verantwoordelijk zijn voor het overleven van (stamcel-achtige) leukemie cellen na therapie en het vormen van een recidief. Dit zal vervolgens leiden tot nieuwe inzichten over de meest optimale therapie strategieën om refractaire (geen respons op therapie bij diagnose) en recidief-vormende leukemie cellen te elimineren. Omdat er vergelijkbare problemen in patiënten met andere vormen van kanker zijn, zoals de terugkeer en uitzaaiing van solide tumoren veroorzaakt door sub-klonen en kanker stamcellen, zullen de resultaten van dit project mogelijk geëxtrapoleerd kunnen worden naar andere vormen van kanker en ook de overleving en prognose van deze patiënten verbeteren. De resultaten van dit project zullen ook een beter inzicht geven over welke patiënt het beste reageert op welke therapie.

#### Maatschappelijk belang

Elk jaar worden in Nederland 600 patiënten met AML gediagnostiseerd. Zeventig tot 80% van de AML patiënten onder de 60 jaar reageert in eerste instantie goed op de huidige chemotherapie behandeling maar slechts 30-40% van deze patiënten overleeft vijf jaar na diagnose. Voor patiënten ouder dan 60 jaar is de prognose veel slechter en overleeft zelfs maar 10-20% vijf jaar na de diagnose. Deze slechte prognose wordt veroorzaakt doordat het merendeel van de patiënten de ziekte terug krijgt. Voor de



meeste mensen met een AML recidief is op dit moment geen behandeling beschikbaar. Het in dit project gepresenteerde onderzoek zal een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen van nieuwe therapieën en een inzicht geven welke patiënt een respons zal hebben op welke therapie. Dit zal de prognose van deze patiënten verbeteren en zal bovendien ook een kostenbesparing opleveren omdat intensieve chemotherapie bij een recidief of een dure risicovolle stamcel transplantatie mogelijk vervangen kan worden door alternatieve succesvolle nieuwe therapie bij diagnose of na chemotherapie.

Elk jaar worden in Nederland 200-250 patiënten met CML gediagnostiseerd. In 25% van de CML patiënten werkt de behandeling gericht tegen het Philadelphia chromosoom niet en hebben de patiënten kans op ontwikkeling van een acute fase leukemie. In patiënten waarbij de behandeling wel werkt moet deze een leven lang gegeven worden. Naast de vervelende bijwerkingen zoals moeheid, spierkrampen, benauwdheid en diarree, is deze levenslange behandeling van CML patiënten heel erg duur (€30,000-60,000 per patiënt per jaar). Omdat de levensverwachting van een CML patiënt in de laatste 15 jaar flink gestegen is zijn de stijgende kosten een groot economisch probleem. De ontdekking van nieuwe therapieën tegen leukemie cellen die de CML behandeling nu overleven zal mogelijk leiden tot genezing van CML patiënten en de huidige levenslange therapie veranderen in een tijdelijke behandeling.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

In dit project willen we de potentie van door ons geïdentificeerde cel kenmerken/signalering paden om te dienen als therapie doelwit bestuderen en vervolgens nieuwe therapieën (mono en combinatie therapie) gericht tegen deze kenmerken testen voor effectiviteit in het elimineren van leukemie (stam) cellen in het immuun deficiënte muizen model (Figuur 1). Het uiteindelijke doel is om optimale gerichte individuele curatieve therapie te ontwikkelen voor leukemie patiënten waarbij alle leukemie cellen geëlimineerd worden en de vorming van een recidief wordt voorkomen. De uitkomsten van deze dierexperimenten zullen worden vertaald naar een klinische toepassing en zullen hopelijk bijdragen tot een significante verbetering van de overleving van leukemie patiënten.

Voordat de dierproeven gestart worden hebben we kenmerken (leukemie cel intrinsiek of aanwezig in de beenmerg omgeving) geïdentificeerd die mogelijk een rol spelen bij de ontwikkeling van een recidief. Ook hebben we voordat dierproeven gestart worden bewezen dat de geïdentificeerde kenmerken effectieve doelwitten kunnen zijn voor behandeling van leukemie met behulp van *in vitro* en *ex vivo* experimenten.

#### Project Flow chart (Figure 2)

Na het screenen van leukemie monsters voor hun potentie om uit te groeien in het immuun deficiënte muizenmodel (dierproef type 1 in bijlage 1) zullen we (al dan niet met een label/tag voorziende) leukemie cellen (van het diagnose, minimale restziekte of recidief stadium), die wel of niet gemoduleerd zijn in gen expressie, laten uitgroeien in immuun deficiënte muizen. Vervolgens zal de gevormde leukemie getest worden op gevoeligheid voor potentieel succesvolle nieuwe chemotherapie, differentiatie therapie, "targeted" therapie, small molecules tegen signaal moleculen en immuun therapie toegediend als mono- of combinatie-therapie (dierproef 3 in bijlage 3). We verwachten geen compleet nieuwe therapieën te ontdekken maar mocht dit toch zo zijn dan zullen we eerst de maximaal getolereerde dosis waarbij nog effect verwacht wordt gaan testen in het immuun deficiënte muizenmodel (dierproef 2 in bijlage 2). De functie van de omgeving (al dan niet gemanipuleerd) zullen we testen door het injecteren van stromale cellijnen, gezond donor stroma of patiënten stroma cellen of het eerst genereren van een humaan microenvironment en vervolgens inspuiten van de leukemiecellen.

#### Type dierproef 1: bijlage 1

*Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.*

We hebben een grote biobank van AML (en CML) patiënten monsters die afgenomen zijn bij elk stadium van de ziekte en we worden tevens constant voorzien van nieuwe monsters. Voor elke monster is een overeenkomst getekend in overeenstemming met de verklaring van Helsinki en een goedkeuring van de studie groep [REDACTED] [REDACTED]. Van elk monster zijn de chromosomale afwijkingen (cytogenetica), moleculaire afwijkingen en het immuun fenotype van de aanwezige cellen bekend en ook de risicogroep waartoe het monster behoort. In dit gedeelte van het project worden leukemie cellen van leukemie patiënten getest op leukemie initiërende capaciteit (ook wel LSC activiteit genoemd) en uitgroei.

Bovendien zullen we de patiënt cel kenmerken voor en na uitgroei in de muis bekijken en vergelijken met die van de ingespoten cellen. Uit eerdere experimenten is gebleken dat voor de experimenten in bijlage 3 het beste samples gebruikt kunnen worden die meer dan 15% uitgroei hebben in de muizen. We weten uit het verleden dat het succes percentage van samples met uitgroei boven de 15% ongeveer 15% is (15% van het leukemie patiënten materiaal geeft een uitgroei boven de 15% in de immuun deficiënte muis. Dit onderdeel van het project zal zorgdragen voor een constant aanwezigheid van patiënten monsters om de experimenten binnen dit project uit te voeren.

#### Type dierproef 2: bijlage 2

*Bepalen van de maximaal tolereerbare dosis van een nieuw medicijn in het muizen model: bepalen van toxiciteit bij dosis waarbij effect verwacht wordt.*

Voordat we nieuwe therapieën, nooit eerder getest in de muis, zullen testen in het immuun deficiënte muizen model voor effect op leukemie (stam) cel eliminatie (bijlage 3) zullen we eerst de maximaal getolereerde dosering (MTD), waarbij effect te verwachten is, bepalen. We zullen een experiment doen waarbij verschillende concentraties van de nieuwe therapie geïnjecteerd worden in de muizen. Vervolgens zal het ontstaan van toxiciteit in de muizen gevolgd worden. Door middel van goed observeren zullen ziekteverschijnselen na de toediening van de therapie bekeken worden en aan het aan het einde van het experiment (tussen week 16-20) zullen de muizen opgeofferd worden en de organen (lever, darmen, hart, normale bloedcellen, beenmerg, nieren) worden bestudeerd voor afwijkende/toxiciteit verschijnselen. Ook zullen we bloedafnames doen en de concentraties van het geneesmiddel in het bloed bepalen op verschillende tijdstippen na therapie toediening.

#### Type dierproef 3: bijlage 3

*Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen.*

Met dit type dierproef hebben we de volgende doelstellingen:

*1. De identificatie van kenmerken (genen) die een rol spelen bij leukemie initiatie, LSC activiteit, therapie gevoeligheid, proliferatie en differentiatie.*

Of de door ons geïdentificeerde cel kenmerken (leukemie intrinsiek en/of geïnduceerd vanuit de omgeving) invloed hebben op leukemie initiatie, LSC activiteit, proliferatie, differentiatie en therapie gevoeligheid van leukemie cellen zal worden onderzocht. We zullen de expressie van cel kenmerken *in vitro* beïnvloeden in leukemie cellen (cellijnen of patiënt leukemie cellen) en vervolgens deze cellen injecteren in de muizen. De muizen zullen vervolgens wel of niet met therapie behandeld worden. Na 16-20 weken zal de uitgroei van leukemie en normale cellen in de muizen bekeken worden (Figuur 2). Omdat ongevoeligheid tegen de huidig gebruikte therapie intrinsiek kan ontstaan in leukemie cellen maar ook geïnduceerd kan zijn door het beenmerg stroma van de patiënt zullen we ook testen of het co-injecteren van beenmerg stroma (cellijnen, normaal stroma en patiënten stroma) of een humaan microenvironment eerst gegenereerd in de muis een veranderde uitgroei van de leukemie cellen veroorzaakt.

Leukemiecellen met stamcel activiteit zijn leukemie cellen die een onbeperkte mogelijkheid hebben om leukemiegroei te bevorderen en worden ook wel leukemie-initiërende cellen of leukemische stamcellen (LSCs) genoemd. De manier om de frequentie van LSCs in de leukemie te bepalen is het doen van een 1) verdunning cel transplantatie assay 2) een re-transplantatie. Bij een verdunning experiment kan vanuit de hoeveelheid cellen waarbij uitgroei plaatsvindt het aantal LSCs berekend worden en tevens het effect van de modulatie van gen expressie op de overleving van het aantal LSCs. Bij een re-transplantatie, waarbij beenmergcellen vanuit de 1<sup>e</sup> muis waarbij reconstitutie van humane cellen heeft plaatsgevonden naar een 2<sup>de</sup> muis getranplanteerd wordt, kan ook de uitgroei van LSCs aangetoond worden (Figuur 2).

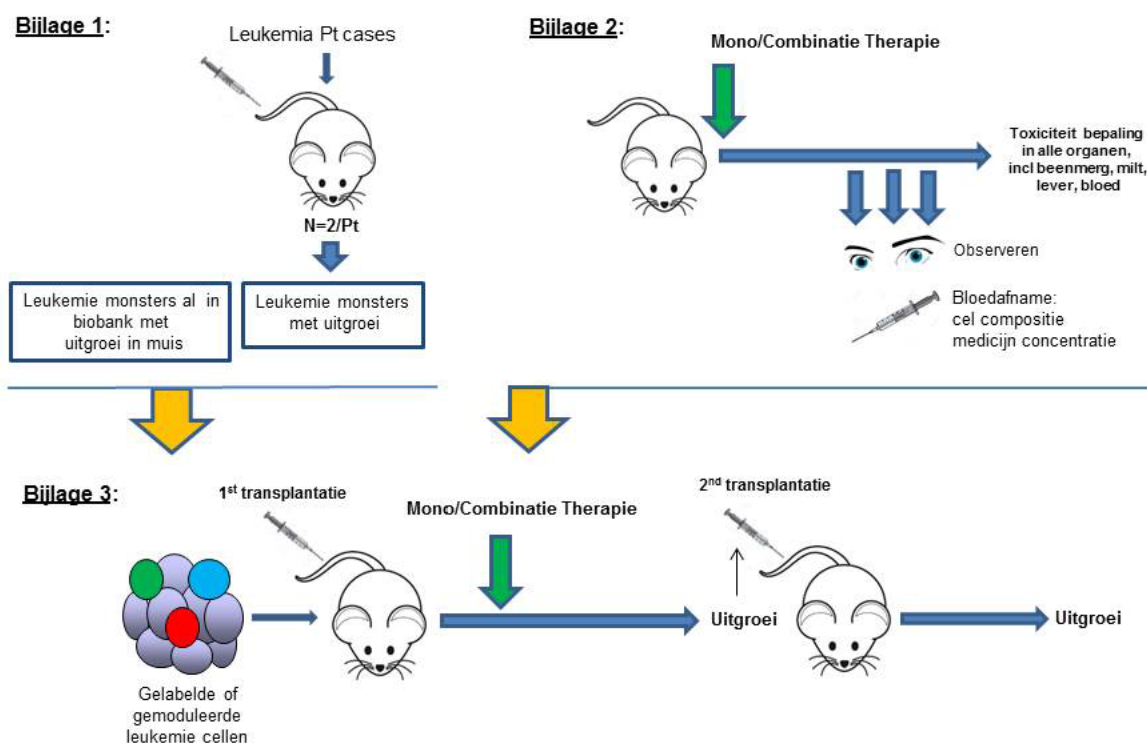
*2. Het preklinisch testen van de effectiviteit van therapie tegen leukemie (sub-klonen en/of LSCs)*

Het testen van bijvoorbeeld chemotherapie, differentiatie therapie, "targeted" therapie, small molecules tegen signaal moleculen en immuun therapie als monotherapie en combinatie therapie bij diagnose, minimale restziekte en het recidief stadium van de leukemie zal in de preklinische fase worden getest in de immuun deficiënte muis. Na het ontdekken van cel kenmerken die mogelijk kunnen dienen als doelwit voor therapie (zie punt 1.) zal al aanwezige therapie of nieuw ontwikkelde therapie preklinisch getest worden op effectiviteit in dit xenograft muizen model. Leukemie cellen (cellijnen of primaire patiënt cellen) zullen subcutaan of intraveneus geïnjecteerd worden in de muis en vervolgens zal de therapie worden toegepast. In sommige experimenten zullen we verschillende leukemie cel fracties (genetisch, epigenetisch of fenotypische gedefinieerd) van leukemie cellen bij diagnose een tag geven (een aminozuur tag, een

fluorescerend label, een DNA tag of een reporter die activiteit van een signalering route aangeeft) en deze fracties gecombineerd of als fractie injecteren in de muis.

Verschillende therapieën zullen vervolgens toegepast worden, wel of niet in combinatie met chemotherapie of differentiatie therapie, om te bestuderen welke cellen overleven en bij welke mono of combinatie therapie de meeste leukemie (stam) cellen dood gaan terwijl de gezonde cellen in leven blijven. Het zal om het uittesten van nieuwe cytostatica gaan maar tevens om “targeted” therapie”, differentiatie therapie en immuuntherapie. Immuuntherapie zal monoclonale antilichaam en cellulaire (bijvoorbeeld CAR-T cel, cytotoxische T cel en natural killer cel therapie) therapie omvatten. Nadat de muizen met of zonder therapie behandeld zijn zal de uitgroei in het beenmerg, het bloed, de milt en de lever van de muizen bekeken worden (Figuur 2). Ook zullen we bloedafnames doen en de hoeveelheid leukemie cellen in het bloed bepalen op verschillende tijdstippen na therapie toediening. We zullen tevens de leukemie cellen die overleven karakteriseren (genetisch, epigenetisch en fenotypisch) om kenmerken te identificeren die de er voor zorgen dat deze cellen resistent tegen of gevoelig voor de gebruikte therapie zijn.

### Flow chart



**Figuur 2:** We zullen in bijlage 1 leukiemonsters testen voor hun potentie om in een immuun deficiënt muizenmodel uit te groeien. De monsters die uitgroeien zullen we gebruiken voor het bestuderen van het effect van gen modulatie en nieuwe therapieën op leukemie (stam) cel groei in bijlage 3. Voor nieuwe therapieën nog nooit getest voor toxiciteit in een immuun deficiënt muizenmodel zullen we eerst een pilot experiment in bijlage 2 doen waarbij de toxiciteit van het geneesmiddel bij de verwachte effectieve dosis getest gaat worden.

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

#### **De onderdelen van het project en de daarbij gebruikte dierproeven**

Ons doel is om effectieve geneesmiddelen te ontwikkelen die (alle) leukemie cellen bij diagnose, na therapie of bij een recidief elimineren. De ontwikkeling van deze nieuwe geneesmiddelen gericht tegen leukemie cellen zal hopelijk bijdragen tot betere overlevingskansen voor leukemie patiënten.

##### Type dierproef 1: bijlage 1

*Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.*

Leukemie cellijnen en patiënten monsters, van verschillende stadia van de ziekte (diagnose materiaal van patiënten die in complete remissie zijn gekomen of die refractair zijn (>5% leukemie in het beenmerg na therapie) waarvan we veel cellen in onze biobank hebben (>100 miljoen), patiënten cellen verkregen na 1<sup>e</sup>, 2<sup>e</sup> en 3<sup>e</sup> chemotherapie kuur, patiënten cellen na een stamceltransplantatie of patiënten cellen bij een recidief) zullen geïnjecteerd (intraveneus, intra-beenmerg of subcutaan) worden in immuun deficiënte muizen. De aanwezigheid van leukemie cellen zal constant gemonitord worden door middel van bloedafname (staart afname) of bioluminescentie imaging (onder narcose) door middel van het detecteren van de met luciferase of fluorescerende eiwitten gelabelde cellen door middel van bioluminescentie imaging (onder narcose). Na maximaal 20 weken zullen het beenmerg, het bloed, de milt en de lever bestudeerd worden op aanwezigheid van humane leukemie en normale bloedcellen. Van elk ingespoten monster zijn de cytogenetica, moleculaire afwijkingen en het immuun fenotype van de cellen voor inspuiting bekend en we zullen na het uithalen van de cellen uit de immuun deficiënte muis deze kenmerken opnieuw bestuderen. Dit gedeelte van het project zal aangeven welke samples, aanwezig in onze biobank, leukemie uitgroei capaciteit hebben maar ook of de uitgegroeide cellen dezelfde kenmerken hebben als de cellen bij diagnose van de patiënt. Deze bijlage 1 zal voor een constante stroom van patiënten monsters zorgen waarmee we alle experimenten binnen dit project kunnen uitvoeren (Figuur 1, bijlage 1).

##### Type dierproef 2: bijlage 2

*Bepalen van de maximaal tolereerbare dosis van een nieuw medicijn in het muizen model: bepalen van toxiciteit bij dosis waarbij effect verwacht wordt.*

Als een nieuw geïdentificeerde therapie nog nooit in het immuun deficiënte muizenmodel getest is zullen we eerst bepalen of er toxiciteit is bij het gebruik van concentraties waarbij effect te verwachten is. We zullen behandelingsprotocollen (injectie frequentie, hoeveelheden en injectie routes) gebruiken die of al eerder gebruikt zijn in immuun deficiënte muizen met vergelijkbare medicijnen (therapie gericht tegen moleculen behorende tot dezelfde signaal transductie routes in gepubliceerde studies) of het medicijn gebruiken in concentraties die bij de patiënt verwacht worden effect te hebben. Als het geneesmiddel verwacht wordt effect te hebben in combinatie met chemotherapie of differentiatie therapie zullen we in deze bijlage de combinatie testen voor toxiciteit verschijnselen. Na toediening van de therapie zal de algemene gezondheid van de muizen bestudeerd worden. Ziekte verschijnselen zoals het verminderen van de eetlust, gewichtsverlies, lethargie, gekromde rug, geen gladde vacht zullen nauwkeurig bestudeerd worden. Vervolgens zal na het opofferen van de muizen de normale muizen hematopoëse (witte bloedcellen, neutrofielen, granulocyten, rode bloedcellen en plaatjes aantallen), de organen (necrose aan of afwezig), en het beenmerg (cel compositie) bestudeerd worden.

##### Type dierproef 3: bijlage 3

*Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen.*

We zullen de expressie van cel kenmerken *in vitro* beïnvloeden in leukemie cellen (cellijnen of patiënt leukemie cellen) en vervolgens deze al dan niet gelabelde leukemie cellen injecteren in de muizen. Ook zullen we al dan niet gelabelde leukemie cellen met een hoge en een lage expressie van een cel kenmerk met behulp van flow cytometrie vanuit een leukemie populatie worden opgezuiverd (het isoleren van cel fracties) en in een bepaalde hoeveelheid (van 10 tot 10<sup>7</sup> cellen) in de muis worden ingespoten. Na injectie van de cellen (cellijnen of patiënt cellen) zal wel of niet therapie worden toegepast. Na maximaal 20 weken

zullen het beenmerg, het bloed, de milt en de lever bestudeerd worden op de aanwezigheid van humane leukemie en normale bloedcellen met behulp van flow cytometry. De humane leukemie en normale cellen kunnen onderscheiden worden van de muizencellen door middel van antilichamen gericht tegen humane leukemische en normale membraan markers die specifiek tot expressie komen op één van de beiden cel typen. Het percentage leukemie cellen in het beenmerg van de muizen is een maat voor de uitgroei van de AML cellen. Het aantal leukemie cellen dat leukemie vorming kan geven in een verdunnings assay is een maat voor het aantal leukemie-initiërende cellen (LSCs) binnen de populatie. Met behulp van een re-transplantatie kan bepaald worden of het aantal LSCs door een behandeling met een therapie verminderd zijn.

Moduleren van gen expressie in leukemie cellen: Het genereren van leukemie en/of normale humane bloed cellen met gemoduleerde gen expressie zal *in vitro* gebeuren met behulp van verschillende methoden waaronder RNAi, CRISPR-CAS9 en overexpressie. Vervolgens zullen de leukemie cellen waarin de expressie van de geïdentificeerde cel kenmerken gemoduleerd zijn subcutaan, intraveneus of in het beenmerg worden geïnjecteerd. Na injectie van de cellen zal wel of niet therapie worden toegepast.

Keuze therapie: De gekozen therapie strategie zal gebaseerd zijn op de identiteit van de genen (therapie doelwitten) die door ons ontdekt worden in het laboratorium als potentieel succesvolle therapie doelwitten waarbij de leukemie (stam) cellen worden gedood. Deze therapieën zullen dus vaak gericht zijn tegen een gen of afwijking en daarom “targeted therapy” genoemd. Doelgerichte therapie is een behandeling met medicijnen die de groei en deling van kankercellen blokkeren doordat ze de werking van moleculen die de kankercellen nodig hebben om te overleven remmen. Als door ons geïdentificeerde genen mogelijk betrokken zijn bij overleving van kankercellen kunnen we deze rechtstreeks als doelwit gebruiken. Over het algemeen kun je “targeted” therapie indelen in twee groepen: de monoclonale antilichamen en de “small molecules”. De “small molecules” werken over het algemeen vanuit de binnenkant van de cel en blokkeren daar signaal transductie routes die de overleving van de kankercel remmen. Antilichamen zijn vaak gericht tegen membraan eiwitten die ook de signaaltransductie routes kunnen blokkeren die de kankercellen nodig hebben om te overleven. Als de door ons geïdentificeerde genen potentieel betrokken zijn bij de functie van het immuunsysteem zullen we gebruik gaan maken van immuuntherapie. Op het moment is er veel belangstelling voor het gebruik van immuuntherapie in verschillende vormen (CART cells, Bite antilichamen en antilichamen gekoppeld aan toxines bijvoorbeeld) waarbij gebruik wordt gemaakt van een behandeling die er voor zorgt dat het eigen afweersysteem de kankercellen beter kan vernietigen.

We zullen in enkele gevallen de leukemie cel fracties (genetisch, epigenetisch of fenotypische gedefinieerd) een tag geven (dit kan een aminozuur tag, een fluorescerend label, een DNA tag of een reporter zijn) en deze fracties gecombineerd of als fractie injecteren in de muis. Vervolgens zullen we verschillende mono en combinatie therapieën toepassen.

De aanwezigheid van leukemie cellen zal constant gemonitord worden door middel van bloedafname of het detecteren, door middel van bioluminescentie imaging, van met luciferase of fluorescerende eiwitten gelabelde cellen. Na maximaal 20 weken zullen het bloed, het beenmerg, de milt en de lever bestudeerd worden op de aanwezigheid van humane leukemie en normale bloedcellen en kan er gekeken worden wat het effect van de modulatie van de genen en/of de therapie op de uitgroei potentie van de leukemie (stam) cellen en de normale cellen is.

---

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.

---

In de experimenten in dit project zullen we leukemie cellijnen maar ook leukemie cellen afkomstig van patiënten, die uitgroei geven in het immuun deficiënte muizenmodel, gebruiken. In het verleden hebben we veel monsters getest voor uitgroei potentie en we hebben op dit moment dan ook verschillende monsters in onze biobank om de experimenten in bijlage 3 te kunnen uitvoeren. Om de komende 5 jaar genoeg monsters te hebben om alle experimenten uit te voeren moeten we doorgaan met het testen zodat een constante aanvulling van monsters met uitgroei potentie gegarandeerd is (Bijlage1). Bijlage 1 zal dus gedurende de 5 jaar van het project lopen.

Het onderzoek zal gericht zijn op de identificatie van nieuwe effectieve therapeutische strategieën (in de meeste gevallen in combinatie met chemotherapie of differentiatie therapie) tegen leukemie (stam) cellen.

De door ons ontdekte therapie doelwitten of strategieën zullen altijd eerst *in vitro* getest worden voor hun potentie als therapie doelwit. Vervolgens zullen we testen of gen modulatie of de nieuwe therapie (mono of combinatie therapie) effectief is in het elimineren van leukemie in het immuun deficiënte muizen model (Bijlage 3). We verwachten dat de meeste drugs/geneesmiddelen die we gaan identificeren al eerder beschreven zijn voor andere aandoeningen en kanker typen en al eerder getest zijn in een immuun deficiënt muizenmodel. Deze nieuwe geneesmiddelen zullen dan niet getest hoeven worden voor toxiciteit in bijlage 2. Als een medicijn nooit eerder bestudeerd is in dit muizenmodel zullen we aan de hand van de gegevens van wel geteste vergelijkbare therapieën behorende tot dezelfde groep van geneesmiddelen (gerichte tegen moleculen in dezelfde signaal transductie routes) de toxiciteit bij verschillende concentraties testen (Bijlage 2). Vanuit bijlage 1 zullen monsters geselecteerd worden die in bijlage 3 gebruikt gaan worden. Helemaal nieuwe therapieën zullen in bijlage 2 getest worden op toxiciteit en dan in bijlage 3 gebruikt worden voor hun effect op overleving van leukemie (stam) cellen.

Het uiteindelijke doel is om optimale gerichte individuele curatieve therapie te ontwikkelen zodat alle leukemie cellen geëlimineerd worden en recidief wordt voorkomen. De uitkomsten van deze dierexperimenten zullen bij succes snel worden vertaald naar een klinische toepassing en zullen hopelijk bijdragen tot een significante verbetering van de overleving van leukemie patiënten.

Mijlpalen en keuzemomenten:

**Voordat muizenproeven gedaan zullen worden:**

Alle lopende projecten in ons laboratorium hebben als uiteindelijk doel om therapie te ontwikkelen die de terugkeer van leukemie tegen gaat en alle leukemiecellen in de patiënt kan doden. De AML terugkeer wordt veroorzaakt door in het lichaam achtergebleven LSCs die opnieuw kunnen uitgroeien tot een leukemie. Naast LSCs zitten er ook normale hematopoietische stamcellen, verantwoordelijk voor het herstel van de normale bloedcellen na therapie, in het beenmerg van de leukemie patiënt. Het succes van een therapie is daarom afhankelijk van de modulatie van genen die uiteindelijk tot de dood van LSCs leiden maar waarbij de normale cellen gespaard blijven. Aan de hand van de karakterisatie (genetische en epigenetische expressie profilering) van opgezuiverde leukemie (stam) cellen voor en na therapie van patiënten hebben we kenmerken geïdentificeerd die mogelijktherapie aangrijpingspunten zijn. We kunnen, gebruik makend van leukemie cellijnen en patiënten cellen, in een reageerbuis testen of medicijnen gericht tegen deze genen in staat zijn om de leukemie (stam) cellen te elimineren. Zodra we zien dat deze medicijnen effectief zijn *in vitro* (leukemie cellijnen worden gedood) en *ex vivo* (patiënten leukemie cellen worden gedood en normale cellen blijven leven) door het medicijn zullen we de effectiviteit van het medicijn in het muizenmodel testen. Voordat we muizenproeven starten zullen dus altijd in het laboratorium hebben plaatsgevonden:

- a. *In vitro* identificatie van kenmerken (leukemie cel intrinsiek of aanwezig in de beenmerg omgeving) die mogelijk een rol spelen bij de ontwikkeling van een recidief.
- b. *In vitro* en *ex vivo* identificatie van effectieve behandelingen die leukemie cellen kunnen elimineren en normale gezonde cellen sparen.

**Muizenproeven**

**Bijlage 1:** Het genereren van een biobank van myeloïde leukemie monsters die de capaciteit hebben om in de immuun deficiënte muis uit te groeien. Selectie van leukemie monsters geschikt voor muizen experimenten.

**Bijlage 2:** Bepalen van de maximaal getolereerde dosis waarbij een effect mogelijk is. Als het medicijn in een dosering moet worden toegepast waarbij veel toxiciteit verwacht wordt gaan we deze therapieën niet gebruiken in bijlage 3. Go/No go beslissing.

**Bijlage 3:** Testen van de doelwitten/therapieën voor hun effectiviteit om leukemie cellen te elimineren en gezonde cellen te sparen.

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

| Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | <i>Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.</i> |
| 2          | <i>De bepaling van de maximaal getolereerde dosis (MTD) van een nieuwe therapie in de</i>                                  |

|    |  |
|----|--|
|    | <i>immuundeficiëntie muis</i>  |
| 3  | <i>Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen.</i> |
| 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

|     |   |  |  |
|-----|---|--|--|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.  | 11400  |  |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in.  | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC), Amsterdam |  |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.<br><br><i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | Volgnummer   | Type dierproef   |
|     |   | 1  | <i>Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.</i> |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De dierproef beschreven in deze bijlage 1 zal worden gebruikt om te bestuderen of leukemie patiënten samples leukemie cellen bevatten die aanslaan (gaan groeien) in het immuundeficiënte muizenmodel en tevens of deze leukemie cellen na uitgroei dezelfde kenmerken behouden als dat ze in de patiënt hadden. Deze patiënten samples met de potentie tot uitgroei kunnen dan gebruikt worden voor experimenten beschreven in bijlage 3.

Het immuun-deficiënte muizen model is de gouden standaard voor het bestuderen van de overleving en uitgroei van leukemie cellen en is ook het meest gebruikte model voor bestudering van overleving van humane leukemie cellen met stamcel eigenschappen. Voor het testen van nieuwe therapie aanknopingspunten en methoden om leukemie te elimineren (bijlage 3) hebben we humane leukemie monsters nodig die na injectie in een immuun deficiënt muizen model gaan uitgroeien. Wij hebben in het verleden gezien dat in dit muizen model ongeveer 15% van de leukemie patiënten monsters een uitgroei geeft boven de 15%. We gebruiken een hoeveelheid cellen representatief voor 12 complete monsters per jaar om alle experimenten uit te voeren binnen de huidig lopende projecten. We verwachten 80 leukemie monsters per jaar (15% van 80=12) te moeten testen op uitgroei capaciteit om voldoende materiaal te verkrijgen voor onze dierproeven.

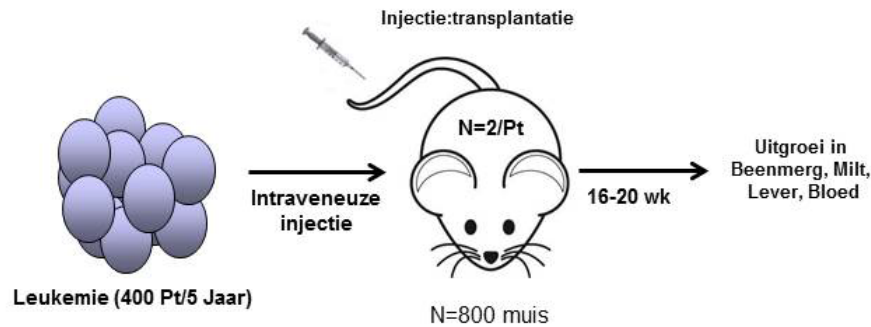
#### Experimentele aanpak (Figuur 1 bijlage 1)

- De muizen worden bestraald om de muizenbeenmergcellen te elimineren en ruimte in het beenmerg te creëren voor de humane leukemie en normale hematopoietische cellen.
- Enige tijd later (1 tot 7 dagen) krijgen de muizen humane leukemie cellen ingespoten (patiënt cellen).
- De uitgroei van de tumoren wordt gevolgd door visuele inspectie (imaging) en/of bloedanalyse.
- Enige tijd later (1-20 weken) zullen de tumor hoeveelheid en karakteristieken van de humane cellen in het



beenmerg, de milt, het bloed en de lever van de muis bekeken worden.

Figure 1 Bijlage 1



**Figuur 1:** We zullen in bijlage 1 leukiemonsters injecteren in immuun deficiënte muizen en de potentie om uit te groeien bestuderen. De monsters die uitgroeien zullen we gebruiken voor het bestuderen van het effect van genmodulatie en nieuwe therapieën op leukemie (stem) cel groei in bijlage 3.

### Primaire uitkomstparameters

Leukemie groei in het beenmerg, het bloed, de milt en de lever van de muizen zal gebruikt worden als uitleesparameter voor de potentie van patiënten cellen om uit te groeien in de muis. Zestien tot twintig weken na injectie van de patiënt cellen worden alle cellen verwijderd uit het beenmerg, de milt en de lever van de muizen en geanalyseerd voor aanwezigheid van humane CD45 en CD33 (myeloïde humane leukemie) en muis CD45 positieve cellen. Dit geeft aan of de cellen afkomstig zijn van de patiënt of van de muis. De expressie van leukemie geassocieerde kenmerken (immunofenotypisch en/of moleculair) zal bekeken worden om te ontdekken of de cellen die uitgegroeid zijn in de immuun deficiënte muizen normaal of leukemisch zijn. Het percentage "uitgroei" (totale hoeveelheid humane cellen/totale hoeveelheid cellen x100) zal bepaald worden maar ook de absolute aantallen van leukemie en muizen cellen in het beenmerg/milt/lever. Het meten van absolute aantallen leukemie cellen is essentieel omdat de hoeveelheid muizencellen die zich vormen in het beenmerg van de muis sterk afhangt van de hoeveelheid leukemie die gevormd wordt. Hoe meer leukemie hoe minder muizencellen. Dit is ook wat gezien wordt in leukemie patiënten waarbij leukemie de ontwikkeling van normale hematopoïetische cellen remt.

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.

### *Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.*

De leukemie cellen van patiënten (waarvan we meer dan 100 miljoen cellen in onze biobank hebben) worden gescreend voor leukemie initiërende/uitgroei capaciteit. Uit eerdere experimenten is gebleken dat het succespercentage ongeveer 66% (>0.1% uitgroei) en 37% (>10% uitgroei) bedraagt (37% van de AML patiënten geeft uitgroei in het NSG muizenmodel waarbij er meer dan 10% humane cellen in het beenmerg waar te nemen zijn)[1].

Voor experimenten beschreven in bijlage 3 hebben we leukemie samples nodig die meer dan 15% uitgroei geven in het immuun deficiënte muizen model. We hebben zelf in het verleden gezien dat dit de frequentie van uitgroei (meer dan 15%) minder is dan beschreven in de literatuur [1] en ongeveer 15% van de samples zijn. Dit onderdeel van het project is nodig om patiënten materiaal te identificeren dat uitgroei vertoont in het immuun deficiënte muizenmodel en dat vervolgens gebruikt kan worden in de experimenten (Flow chart in project voorstel; Figuur 1).

Het betreft experimenten waarbij 6-8 weken oude immuun deficiënte muizen eerst worden bestraald en waarin vervolgens humane primaire leukemie cellen intraveneus worden ingespoten. Op dag 0 krijgen de muizen een sub-letale dosis bestraling wat cytokine productie tot gevolg heeft. Hierdoor wordt uitgroei van (stem)cellen in het beenmerg bevorderd. Op dag 2-7 worden de leukemie cellen toegediend. De muizen krijgen twee weken voor injectie van de leukemiecellen antibiotica in hun drinkwater om infecties te voorkomen en houden dit drinkwater een week na injectie. Op dag 0 worden de cellen toegediend en op dag 140-168 worden de muizen geofferd en wordt de aanwezigheid van leukemie en normale cellen beoordeeld met behulp van flow cytometrie (aanwezigheid van humaan CD45+ en CD33+ cellen voor "uitgroei", CD11b voor differentiatie, CD3 voor T cellen en CD19 voor B cellen) van de cellen in het beenmerg, milt, de lever en het bloed. Mochten er voor dag

140-168 ziekte verschijnselen optreden (gewichtsverlies >15%, drie dagen achter elkaar gemeten of meer dan 20% gewichtsverlies gemeten op 1 dag, malaise (afwijkend gedrag, minder poetsgedrag, gebochelde houding, isolatie uit de groep) dan worden de muizen eerder geofferd en post-mortem de aanwezigheid van leukemie en normale cellen beoordeeld.

Handelingen:

- 1) Bestralen
- 2) Injecteren van leukemie patiënten cellen.
- 3) Offeren van de dieren.

Referentie 1: A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. Leukemia. 2009; 23(11):2109-17.

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

Hoeveelheid muizen nodig (n=800 in 5 jaar)

We injecteren 2 muizen intraveneus met leukemie cellen voor elk patiënten sample. We hebben in het verleden waargenomen dat als twee muizen ingespoten zijn er een vergelijkbaar uitgroei percentage (en absolute aantallen cellen) worden waargenomen in beide muizen aan het eind van het experiment. In het verleden en aan het aantal experimenten beschreven in onze verschillende projecten zien we dat het totale aantal uitvoerbare experimenten in 5 jaar ongeveer 12 nieuwe AML samples met uitgroei potentie per jaar vereist. Om dit te bewerkstelligen moeten we rond de 80 samples (80x15% is 12) per jaar testen voor potentie tot uitgroei. Dit betekent dat we 160 muizen per jaar (800 in 5 jaar) nodig hebben binnen deze bijlage 1.

## B. De dieren

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

Diersoort: Immuun deficiënte muizen. We zullen het NOD/SCID/IL2 gamma chain (NSG) knock-out muizenmodel gebruiken of een immuun deficiënte muis geoptimaliseerd om ook de omgeving te humaniseren, bijvoorbeeld de NRG-SGM3 muis, de NOD.Cg-Kit<sup>W-41J</sup> Tyr<sup>+</sup> Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/ThomJ (NBSGW) muis, de NSG-Tg (hu-SCF), de MISTRG muis en het humane scaffold muizen model waarbij humane beenmerg scaffolds worden ingebracht.

We gebruiken zowel mannetjes als de vrouwtjes muizen tussen de 6-10 weken oud.

Herkomst: De dieren zullen uit eigen fok verkregen worden of gekocht worden bij een erkende proefdier leverancier.

Geschatte aantallen: We zullen voor dit onderdeel 160 dieren per jaar gaan gebruiken. 15% uitgroei frequentie dus 15% van 80=12 samples nodig per jaar. Elke sample wordt in 2 muizen ingespoten dus 160 muizen per jaar. Voor de screening van patiënten cellen hebben we 800 muizen nodig voor de komende 5 jaar (Figuur 2 in Bijlage 3).

Levensstadia: De muizen zullen gebruikt worden als ze 6-10 weken oud zijn.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

X 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.

Vervanging: We zullen in het laboratorium doelwitten ontdekken die mogelijk gebruikt kunnen worden als aangrijpingspunten voor therapie. Deze *in vitro* experimenten worden echter niet als bewijs gezien voor een

effect van de therapie op leukemie (stam)cellen in een organisme. Dit omdat het beenmerg van de leukemie patiënt met het daarbij behorende micromilieu in een *in vitro* situatie niet aanwezig is. De factoren geproduceerd door de stromale cellen van het beenmerg zijn van essentieel belang voor de uitgroei van (stam)cellen. Het is daardoor niet mogelijk om adequaat bewijs te vergaren met behulp van *in vitro* experimenten en er is daarom geen goed alternatief voor deze dierproeven. Het ontwikkelen van geneesmiddelen voor patiënten met leukemie wordt altijd gestart door onderzoek in een reageerbuisje maar zal dan vervolgens *in vivo* in de muis preklinisch getest moeten worden voordat het in de patiënt in een klinische studie gebruikt kan worden.

Vermindering: We hebben een aantal methoden/factoren geoptimaliseerd waardoor bij het doen van de experimenten het aantal proefdieren zo beperkt mogelijk blijft.

- Het gebruik van het immuun deficiënte muizen model laat de beste uitgroei van stamcel achtige cellen zien van de beschikbare muizenmodellen en zal daardoor het aantal benodigde dieren beperkt houden.
- We zullen zowel de mannetjes en de vrouwtjes gebruiken en hebben in het verleden waargenomen dat 2 muizen per patiënten sample genoeg is om een betrouwbaar resultaat te krijgen.
- Omdat er een verhoogd risico op infecties als gevolg van immuundeficiëntie hebben we barrière maatregelen genomen om infecties te voorkomen. De dieren zullen met steriele handschoenen worden gehanteerd en alle handeling vinden plaats onder laminaire flow condities waardoor uitval niet plaatsvindt.
- We zullen altijd de absolute aantallen leukemiecellen in het beenmerg van de muis bekijken (door het verwijderen van alle cellen uit het beenmerg). Dit voorkomt heterogeniteit van "uitgroei" veroorzaakt door de variatie in hoeveelheid muizencellen in het beenmerg en zal het aantal muizen dat nodig is om reproduceerbare resultaten te krijgen beperken tot 2 per patiënten sample

Verfijning: De noodzakelijke dierproeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in de muis. De kennis en expertise opgebouwd uit het kanker onderzoek in muizen met een defect immuunsysteem in ongekend groot en deze muis is dan ook uitermate geschikt om nieuwe behandelmethoden voor leukemie te bestuderen. We zullen de experimenten binnen dit project op een zodanige manier opzetten dat de dieren zo min mogelijk ongerief ondervinden tijdens het experiment. De dieren zullen goede huisvesting hebben en de uitvoering van de experimenten zal alleen gebeuren door bevoegd en bekwaam personeel. We hebben een aantal analisten met veel proefdierervaring in dienst. Dieren zullen in een eerder stadium dan het verkrijgen van matig ongerief of sterfte door de leukemie getermineerd worden, waarna de verdere analyses *in vitro* plaats vinden. Dit voorkomt onnodig lijden en ernstig ongerief voor de dieren. De dieren zullen in individueel geventileerde kooien worden gehuisvest wat de kans op infectie zal verkleinen. Ook krijgen de dieren tijdens (een deel van) het experiment antibiotica in hun drinkwater.

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.

Gedurende het hele experiment zullen maatregelen genomen worden om de kans op pijn, lijden en angst bij de dieren tot een minimum te beperken.

- Dit zal bewerkstelligd worden door optimale huisvesting van de dieren en uitvoering van de experimenten door zeer bekwaam personeel.
- De lengte van het experiment is zo gekozen dat de kans op ernstige ziekte als gevolg van de leukemie minimaal is, maar lang genoeg om leukemie te kunnen detecteren.

Bij het eindpunt van het experiment worden de dieren onder narcose gedood.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

De dierproeven uitgevoerd met patiënten samples zijn nog niet eerder uitgevoerd omdat de te gebruiken patiënten samples uniek aanwezig zijn in onze aangelegde biobank

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

verzorgd?

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het bestralen van de dieren kan er voor zorgen dat de dieren een lichte terugval in gewicht krijgen. Dit zal leiden tot licht ongerief. De toediening (intraveneus) van de leukemie cellen is eenmalig waardoor het ongerief beperkt blijft. Euthanasie onder narcose en het wegvan van de dieren zal licht ongerief geven. De dieren ingespoten met leukemie cellen kunnen anemie ontwikkelen wat enkele dagen kan duren. Dit kan matig ongerief geven voor maximaal twee dagen. In het verleden hebben we waargenomen dat dit bij ongeveer bij 5% van de dieren plaatsvindt. Omdat immuundeficiëntie dieren gebruikt worden is er een verhoogd risico op infecties wat het welzijn van de dieren kan aantasten. Ervaring uit het verleden leert dat uitval, en het gepaarde ongerief, als gevolg van een infectie niet voorkomt.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak van de dip (gewichtsverlies) na de bestraling wordt veroorzaakt door algehele malaise en het niet/minder eten van de dieren met als mogelijke oorzaak het ziek voelen. De anemie wordt veroorzaakt doordat de dieren leukemie in het beenmerg en de milt krijgen.

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

Na de bestraling geven we het voer in de bak zodat de dieren makkelijkere toegang hebben tot het voedsel. Ook geven we het voedsel in pap vorm om de eetlust en de drempel om te eten van/voor de dieren te verhogen.

## 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.

De criteria voor humane eindpunten zijn als volgt:

Mochten er voor dag 140-168 ziekteverschijnselen optreden bijvoorbeeld gewichtsverlies > 15% t.o.v. dag 1 op drie opeenvolgende dagen of op 1 dag meer dan 20%, algehele malaise (afwijkend gedrag, afwijkende houding (kromming van de rug) minder poetsgedrag, afwijkende vacht (pilo-erectie), isolatie uit de groep) dan worden de muizen eerder getermineerd en post-mortem de mogelijke aanwezigheid van leukemie beoordeeld.

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

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.

| Exp. Handelingen                     | Kwalificatie ongerief* | Duur  |
|--------------------------------------|------------------------|---|
| Transport naar bestralingsfaciliteit | Licht                  | 10 minuten (100% van de muizen)   |
| Bestraling (subletale dosis)         | Licht                  | Enkele minuten (eenmalig)<br>Een week na de bestraling kan er een dip in gewicht optreden wat veroorzaakt wordt door een kortdurende afname van voedselintake/welbevinden (100% van de muizen). |
| Toediening van leukemie cellen       | Licht                  | Enkele minuten, Eenmalig (100% van de muizen)   |
| Leukemie vorming-anaemie             | Matig                  | Maximaal 2 dagen voor 5% van de dieren.   |
| Lichte narcose toedienen             | Licht                  | Eenmalig, 1 minuut (100% van de dieren)   |
| Wegen                                | Licht                  | Meerdere malen, minuten (100% van de dieren)  |
| Doden van de dieren                  | Licht                  | Onder anesthesie, enkele minuten (eenmalig).  |

Het cumulatieve ongerief zal matig zijn voor 5% (n=40) van de dieren.

## 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 einde van het experiment worden de dieren gedood om post mortem de leukemie die in de dieren zit te analyseren

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

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

### 1 Algemene gegevens

- | 1.1        | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.  | 11400   |            |                |   |  |
|------------|---|---|------------|----------------|---|--|
| 1.2        | Vul de naam van de instelling of organisatie in.  | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC), Amsterdam  |            |                |   |  |
| 1.3        | Vul het volgnummer en het type dierproef in.<br><br><i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table border="1"><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td><i>De bepaling van de maximaal getolereerde dosis van een nieuwe therapie in de immuundeficiëntie muis</i></td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 2 | <i>De bepaling van de maximaal getolereerde dosis van een nieuwe therapie in de immuundeficiëntie muis</i> |
| Volgnummer | Type dierproef  |   |            |                |   |  |
| 2          | <i>De bepaling van de maximaal getolereerde dosis van een nieuwe therapie in de immuundeficiëntie muis</i>                        |   |            |                |   |  |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

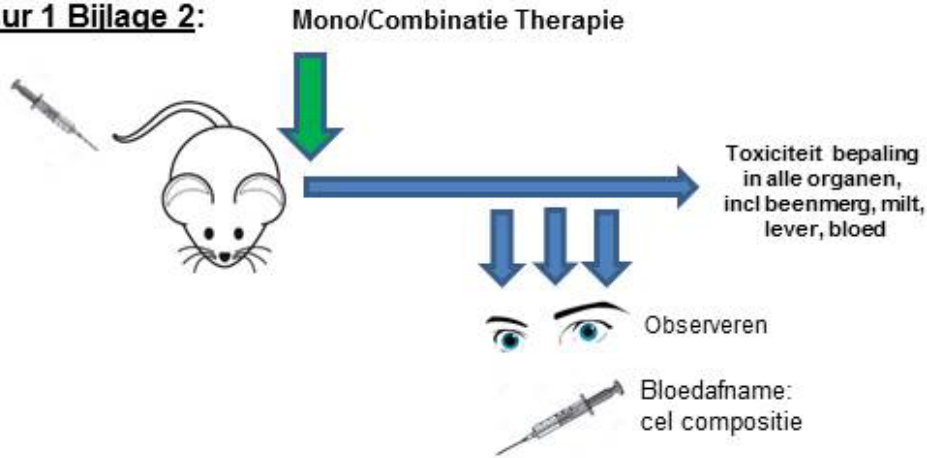
Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voordat we nieuwe therapieën, nooit eerder getest voor inductie van toxiciteit in de immuun deficiënte muis, zullen testen in het muizen model voor het effect op eliminatie van leukemie (stam) cellen (in bijlage 3) zullen we eerst de maximaal (verwachte effectieve) tolereerbare dosis (MTD) bepalen. We zullen een experiment doen waarbij we verschillende concentraties van de therapie zullen injecteren en vervolgens de muizen goed observeren voor het verschijnen van ziekteverschijnselen. Na het opofferen van de muizen rond dag 140-168 zullen we ook de organen (inclusief lever, darmen, hart, normale bloedcellen, nieren) bestuderen op de aanwezigheid van afwijkingen.

#### Experimentele aanpak (Figuur 1 bijlage 2)

- 1) De muizen worden bestraald om de muizenbeenmergcellen te elimineren.
- 2) Enige tijd later (1-7 dagen) krijgen de muizen verschillende hoeveelheden van de nieuwe therapie (mono of combinatie therapie) geïnjecteerd.
- 3) De dieren zullen elke dag gecontroleerd worden op het optreden van ziekteverschijnselen; gewichtsverlies >15% t.o.v. dag 1 voor 3 opeenvolgende dagen of meer dan 25% op 1 dag, algehele malaise (afwijkend gedrag, afwijkende houding (kromming van de rug) minder poetsgedrag, afwijkende vacht (pilo-erectie), isolatie uit de groep.
- 4) Met behulp van bloedafnames op verschillende tijdstippen na injectie van de therapie zullen we de compositie (muizen bloedcellen) van het bloed bepalen (totale witte bloedcellen, rode bloedcellen, hemoglobine, plaatjes, neutrofielen, granulocyten, monoccyten, T cellen en B cellen).
- 5) Na 140-168 dagen zullen het bloed, het beenmerg en alle organen van de muizen worden uitgenomen en bekeken worden op cel compositie en afwijkingen.

**Figuur 1 Bijlage 2:**



**Figuur 1:** De muizen zullen bestraald worden en vervolgens zal een nieuwe therapie (in combinatie met bijvoorbeeld chemotherapie) nog nooit getest in het immuun deficiënte muizenmodel in verschillende doseringen worden geïnjecteerd. Toxiciteit zal bestudeerd worden.

### Primaire uitkomstparameters

- 6) Als uitkomstparameter gebruiken we toxiciteit, afwijkingen in cel compositie van beenmerg, bloed en organen van de muis. We zullen de dieren observeren voor aanwezigheid van ziekte verschijnselen; gewichtsverlies >15% t.o.v. dag 1 voor 3 opeenvolgende dagen of meer dan 20% op 1 dag, malaise (afwijkend gedrag, minder poetsgedrag, gebochelde houding, isolatie uit de groep). Als deze ziekteverschijnselen zich voordoen worden de muizen geofferd en post-mortem de normale muizen hematopoëse (hoeveelheid witte bloedcellen, rode bloedcellen, hemoglobine, plaatjes, neutrofielen, granulocyten, rode bloedcellen en plaatjes, monocytten, T cellen en B cellen), de organen (necrose verschijnselen), en het beenmerg (compositie) bestudeerd. Ook zullen we door middel van bloedafnames op verschillende tijdstippen na injectie van de therapie de cel compositie (muizen bloedcellen) van het bloed bepalen. Op dag 140-168 zullen alle dieren worden geofferd en de normale muizen hematopoëse, de organen, en het beenmerg op afwijkingen bestudeerd worden.

Een voorbeeld van een MTD chemotherapie studie in het immuun deficiënte muizenmodel is beschreven in referentie 1.

- 1) AML cells are differentially sensitive to chemotherapy treatment in a human xenograft model (2013) Blood. 121(12):e90-7.

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.

We zullen immuun deficiënte muizen met verschillende hoeveelheden van de nieuwe therapie (meerdere malen) injecteren en de toxiciteit met behulp van bloedafnames en op het eindpunt (140-168 dagen) meten. We zullen concentraties en behandelingsprotocollen (injectie frequentie, hoeveelheden en injectie route) gebruiken die al eerder gebruikt zijn in immuun deficiënte muizen (gepubliceerde studies) en/of in studies met vergelijkbare medicijnen (medicijnen die tot dezelfde klasse of signaal transductie route behoren). We zullen concentraties gebruiken waarvan we verwachten dat ze remming zullen hebben op de leukemie vorming en die ook eventueel in de patiënt gebruikt worden of zullen worden.

6-8 weken oude immuun deficiënte muizen eerst worden bestraald en vervolgens zal na 1-7 dagen de therapie worden toegediend. Bloed afnames zullen verschillende malen worden gedaan en mochten er voor dag 140-168 ziekte verschijnselen optreden dan worden de muizen geofferd en wordt de aanwezigheid van normale muizen hematopoëse, de organen (necrose verschijnselen), en het beenmerg (compositie) bestudeerd.

De nieuwe therapie zal als monotherapie of in combinatie met bijvoorbeeld chemotherapie of differentiatie therapie worden toegediend. We zullen drie concentraties van de nieuwe therapie (wel en niet in een combinatie) toedienen. Dit zal binnen 1 experiment 8 groepen van muizen geven (Tabel1 Bijlage 2).

Tabel 1

| Groep muizen                     | Therapie  |
|----------------------------------|---|
| 1) n=5 Controle                  | Geen therapie                                     |
| 2) n=5 Injectie mono conc1       | Nieuwe therapie in laagste concentratie           |
| 3) n=5 Injectie mono conc2       | Nieuwe therapie in middelste concentratie         |
| 4) n=5 Injectie mono conc3       | Nieuwe therapie in hoogste concentratie           |
| 5) n=5 Injectie conc1+ Therapie2 | Nieuwe therapie in laagste conc+ conc Therapie2   |
| 6) n=5 Injectie conc2+Therapie2  | Nieuwe therapie in middelste conc+ conc Therapie2 |
| 7) n=5 Injectie conc3+Therapie2  | Nieuwe therapie in hoogste conc+ conc Therapie2   |
| 8) n=5 Injectie Therapie2        | Conc Therapie 2                                   |

Meestal zal de tweede therapie of chemotherapie of differentiatie therapie zijn.

**Chemotherapie:** We zullen een schema van toediening aanhouden waarbij cytarabine voor een aantal dagen wordt toegediend (intraperitoneaal of intraveneus) en waarbij dit in de eerste dagen gecombineerd wordt met een anthracycline, bijvoorbeeld doxorubicin of daunorubicin. Dit schema hebben we in het verleden gebruikt en is beschreven in een publicatie [1].

**Differentiatie therapie:** Voor het toedienen van differentiatie therapie zoals all trans retinoic acid (ATRA) zullen ATRA of controle pellets subcutaan geïmplementeerd worden onder een lichte narcose en pijnstilling. De muizen zullen op de plek van inbreng (nek) geschoren worden en een kleine insertie krijgen. Vervolgens zal de pellet ingebracht worden met een holle naald en de insertie met een hechting worden gedicht. Na de inbreng van de pellets krijgen de dieren pijnstilling in het drinkwater.

Handelingen:

1. Bestralen
2. Injecteren van de therapie (injectieroute en frequentie afhankelijk van therapie)
3. Bloedafnames (maximaal 1x per week, drie keer via staart vene of wang prik).
4. Offeren van de dieren (uitnemen van organen, bloed en beenmerg).

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

We verwachten dat de meeste therapieën die we identificeren al eerder in muizenstudies of klinische trials getest zijn (in andere tumor types of in andere combinaties). We verwachten dan ook niet meer dan 2 nieuwe therapieën in 5 jaar te ontdekken die nog nooit in een muizenmodel zijn getest. In bijlage 2 zullen we compleet nieuwe therapieën, nog nooit getest in een immuun deficiënt muizenmodel, testen voor toxiciteit door het toedienen van 3 verschillende concentraties (wel of niet in combinatie met een tweede therapie). We zullen drie groepen van muizen inspuiten met verschillende concentraties (met en zonder een additionele therapie). Uiteindelijk zullen dit 8 groepen geven, inclusief controles en de tweede therapie als monotherapie (Tabel 1 Bijlage 2). We verwachten bij toxiciteit door de nieuwe therapie een daling van het aantal cellen in de organen, het bloed of het beenmerg van minstens 18% om het afwijkend te noemen. De verwachte standaard deviatie is 10%. Bij een power van 80% ( $\beta = 20$ ,  $z_\beta = 0.84$ ) en een significantie van 0.05 ( $\alpha$ ) wordt het aantal muizen per groep:  $2 \times (z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2) = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 25^2 = 3.9$ . Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 4. Als er 4 dieren in een groep zitten kan het voorkomen dat er bij uitval van 1 van de muizen (door andere redenen dan toxiciteit van de therapie) geen significante resultaten zijn en we nemen daarom altijd 5 dieren per groep. We verwachten 2 experimenten in 5 jaar te doen met 40 dieren in een experiment (8x5) wat een totaal van 80 dieren is. Het totale aantal dieren in dit deel van het project is **80** (Figuur 2 bij Projectvoorstel).

## B. De dieren

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

**Diersoort:** Immuun deficiënte muizen. We zullen het NOD/SCID/IL2 gamma chain (NSG) knock-out muizenmodel gebruiken of een immuun deficiënte muis geoptimaliseerd om ook de omgeving te humaniseren, bijvoorbeeld de NRG-SGM3 muis, de NOD.Cg-Kit<sup>W-41J</sup> Tyr<sup>+</sup> Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/ThomJ (NBSGW) muis, de NSG-Tg (hu-SCF), de MISTRG muis en het humane scaffold muizen model waarbij humane beenmerg scaffolds worden ingebracht.

We gebruiken zowel mannetjes als de vrouwtjes muizen tussen de 6-10 weken oud.

**Herkomst:** De dieren zullen uit eigen fok verkregen worden of gekocht worden bij een erkende proefdier leverancier.

**Geschatte aantallen:** We zullen voor dit onderdeel 80 dieren (2 experimenten van 40 muizen voor het testen



van de toxiciteit van twee therapieën) in 5 jaar gaan gebruiken (Figuur 2 in Bijlage 3).  
Levensstadia: De muizen zullen gebruikt worden als ze 6-10 weken oud zijn.

### 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: We zullen in het laboratorium doelwitten ontdekken die mogelijk gebruikt kunnen worden als aangrijpingspunten voor therapie. Deze therapieën kunnen helemaal nieuw zijn en toxiciteit geven in de muis. Voordat een nieuwe therapie in een grote groep muizen getest kan worden voor het elimineren van de leukemie moet eerst gekeken worden of de therapie schade, toxiciteit geeft aan organen in een compleet organisme. Deze toxiciteit studies zijn niet mogelijk door middel van *in vitro* studies omdat de organen en de samenstelling van bloed en beenmerg na behandeling met een medicijn alleen in een compleet organisme bekeken kan worden.

Vermindering: We hebben een aantal methoden/factoren geoptimaliseerd waardoor bij het doen van deze toxiciteit experimenten het aantal proefdieren zo beperkt mogelijk blijft

- Er is een verhoogd risico op uitval door infectie op infecties als gevolg van immuundeficiëntie. Dit wordt met barrière maatregelen voorkomen. De dieren worden gehuisvest in individueel geventileerde kooien en zullen met steriele handschoenen gehanteerd. Alle handeling vinden plaats onder laminaire flow condities.
- De proefopzet is zodanig dat bij uitval van 1 dier in een groep de resultaten van de proef nog steeds significant zijn en de proef niet herhaald hoeft te worden.
- Kleine hoeveelheden bloed (bloedmonsters) zullen tijdens de duur van het experiment van alle muizen genomen worden. Doordat we nu maar kleine hoeveelheden bloed nodig hebben om met flow cytometry de aantallen van de bloedcellen te bepalen kunnen we meerdere keren bloed afnemen bij een enkel dier..
- Veel medicijnen (of vergelijkbare medicijnen) zijn al getest voor MTD in het immuun deficiënte muizen model omdat dit muizenmodel wijdverbreid wordt gebruikt voor het ontdekken van therapie tegen allerlei tumoren. Dit zorgt er voor dat maar enkele nieuwe medicijnen (we verwachten maximaal 2 in 5 jaar) getest hoeven te worden voor de MTD in dit model.
- We zullen zowel de mannetjes en de vrouwtjes muizen gebruiken.

Verfijning: De noodzakelijke dierproeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in de muis. De kennis en expertise opgebouwd uit het kanker onderzoek in muizen met een defect immuunsysteem in ongekend groot en deze muis is dan ook uitermate geschikt om nieuwe behandelmethoden voor leukemie te bestuderen. We zullen de experimenten binnen dit project op een zodanige manier opzetten dat de dieren zo min mogelijk ongerief ondervinden tijdens het experiment. De dieren zullen goede huisvesting hebben en de uitvoering van de experimenten zal alleen gebeuren door bevoegd en bekwaam personeel. We hebben een aantal analisten met veel proefdierervaring in dienst. De dieren zullen in individueel geventileerde kooien worden gehuisvest wat de kans op infectie zal verkleinen.

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.

Gedurende het hele experiment zullen maatregelen genomen worden om de kans op pijn, lijden en angst bij de

dieren tot een minimum te beperken. Waar nodig worden de dieren onder anesthesie gebracht en kan pijnstilling worden toegepast.

- Dit zal bewerkstelligd worden door optimale huisvesting van de dieren en uitvoering van de experimenten door zeer bekwaam personeel.
- Bloedafname gebeurt door intraveneuze afname en zal maximaal 3x per week plaatsvinden hetgeen als een maximaal aantal beschouwd wordt waarbij geen pijn of lijden wordt veroorzaakt.

Bij de humane eindpunten van het experiment worden de dieren onder narcose gedood.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

De dierproeven uitgevoerd met deze nieuwe therapieën zijn nog niet eerder uitgevoerd. We hebben verschillende samenwerkingen lopen op het gebied van ontdekking van nieuwe therapie tegen de ontwikkeling leukemie. Deze samenwerkingen zijn op elkaar afgestemd zodat er geen onnodige duplicatie optreedt. Of dezelfde medicijnen getest worden door andere laboratoria zullen we nauwlettend in de gaten houden door het "up to date" blijven met gepubliceerde data maar ook door het bezoeken van congressen waar onderzoeksgroepen die vergelijkbaar werk doen aanwezig zullen zijn. De patiënten samples die wij in de experimenten testen zijn uniek.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voor het toedienen van ATRA of controle pellets zal een lichte narcose en pijnstilling worden toegediend. Na de inbreng van de pellets krijgen de dieren pijnstilling. Tijdens het herstel van de implantatie van de pellets liggen de dieren op een verwarmde mat. Bij het eindpunt van het experiment worden de dieren onder narcose gedood.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het bestralen van de dieren kan er voor zorgen dat de dieren een lichte terugval in gewicht krijgen. Dit zal leiden tot licht ongerief. Euthanasie onder narcose en het wegvan van de dieren zal licht ongerief geven. Omdat immuundeficiëntie dieren gebruikt worden is er een verhoogd risico op infecties wat het welzijn van de dieren kan aantasten. Omdat de dieren een verminderde afweer hebben worden ze gehuisvest in individueel geventileerde kooien waardoor de kans op een infectie laag is. Ervaring uit het verleden leert dat uitval, en het gepaarde ongerief, als gevolg van een infectie niet voorkomt. Als gevolg van de therapie kunnen de dieren bijwerkingen krijgen wat ingeschat wordt als ernstig ongerief voor maximaal een halve dag. Narcose voor inbreng van pellets wordt ingeschat als licht ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De bijwerkingen van de therapie kunnen veroorzaakt worden door schade aan 1 van de organen (bloed, beenmerg, lever, nieren, longen, hart etc) veroorzaakt door de therapie. De oorzaak van de dip (gewichtsverlies) na de bestraling wordt veroorzaakt door algehele malaise en het niet/minder eten van de dieren met als mogelijke oorzaak het ziek voelen.

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

Na de bestraling geven we het voer in de bak zodat de dieren makkelijkere toegang hebben tot het voedsel. Ook geven we het voedsel in pap vorm om de eetlust en de drempel om te eten van/voor de dieren te verhogen. De tijdsduur waarin schadelijke effecten als gevolg van een nieuwe therapie ondervonden worden zal beperkt blijven omdat we de dieren meerdere malen per dag zullen controleren op ziekteverschijnselen (zie humane eindpunten) zodat ernstig ongerief niet langer dan een halve dag zal duren. We zullen de dieren opofferen als ze een humaan eindpunt hebben bereikt als gevolg van de bijwerkingen.

### 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.

De criteria voor humane eindpunten zijn als volgt:

Het kan voorkomen dat bij een bepaalde dosis van een nieuwe therapie pijn kan optreden als gevolg van toxiciteit. Zodra we waarnemen (elke dag observatie) dat er ziekteverschijnselen optreden bij de muizen en het humane eindpunt is bereikt zullen we de dieren meteen opofferen. Mochten er voor dag 140-168 ziekteverschijnselen optreden (gewichtsverlies > 15% t.o.v. dag 1 voor drie opeenvolgende dagen of meer dan 25% op 1 dag, algehele malaise (afwijkend gedrag, afwijkende houding (kromming van de rug) minder poetsgedrag, afwijkende vacht (pilo-erectie), isolatie uit de groep) dan worden de muizen eerder getermineerd en post-mortem de aantasting van bloed, beenmerg en alle organen bepaald. Omdat onbekend is welke doseringen van een nieuwe therapie bijwerkingen geven en hoe de pijn ingeschaald moet worden we bij ziekteverschijnselen door de therapie het ongerief ingeschat als ernstig.

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

We verwachten dat in 25% van de dieren binnen een experiment ziekteverschijnselen kunnen optreden als gevolg van toediening van een bepaalde dosering van de therapie. Deze dieren zullen het humane eindpunt bereiken voor het einde van het experiment en opgeofferd worden.

## 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.

| Exp. Handelingen                     | Kwalificatie ongerief | Duur   |
|--------------------------------------|-----------------------|--|
| Transport naar bestralingsfaciliteit | Licht                 | 10 minuten (100% van de muizen)  |
| Bestraling (subletale dosis)         | Licht                 | Enkele minuten (eenmalig) Een week na de bestraling kan er een dip in gewicht optreden wat veroorzaakt wordt door een kortdurende afname van voedselintake/welbevinden (100% van de muizen). |
| Toedienen therapie                   | Licht                 | Enkele minuten, meermalig  |
| Toxiciteit                           | Ernstig               | Maximaal een halve dag (25% van de muizen)   |
| Lichte narcose toedienen             | Licht                 | Eenmalig, 1 minuut   |
| Wegen                                | Licht                 | Meerdere malen, minuten  |
| Doden van de dieren                  | Licht                 | Onder anesthesie, enkele minuten (eenmalig)  |

Het cumulatieve ongerief zal ernstig zijn voor naar schatting 25% (20 muizen) van de muizen.

## 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 einde van het experiment worden de dieren gedood om post mortem de toxiciteit/afwijkingen veroorzaakt door de therapie in de dieren te analyseren

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

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

### 1 Algemene gegevens

- | 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.  | 11400  |            |                |   |   |
|---|--|------------|----------------|---|---|
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.  | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC), Amsterdam   |            |                |   |   |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.<br><br><i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table border="1"><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>3</td><td><i>Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen in de muis.</i></td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 3 | <i>Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen in de muis.</i> |
| Volgnummer  | Type dierproef   |            |                |   |   |
| 3   | <i>Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen in de muis.</i>  |            |                |   |   |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

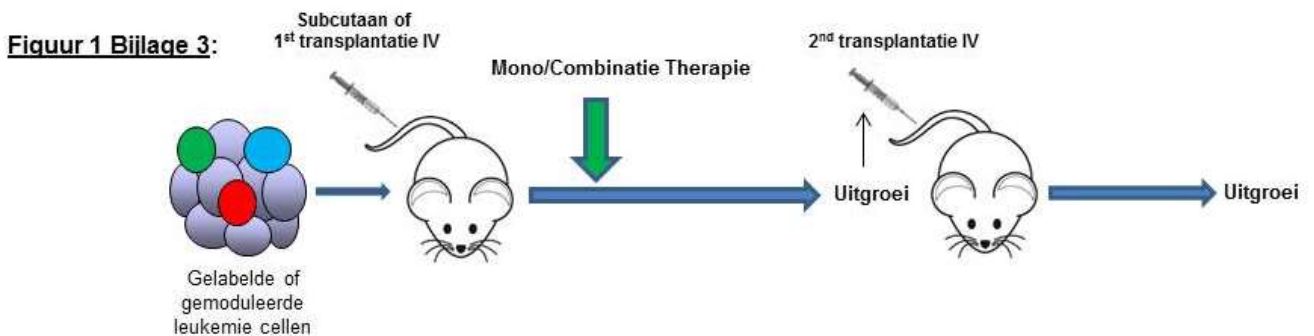
De keuze voor het immuun deficiënte muizen model voor het testen van nieuwe therapie aanknopingspunten en methoden om leukemie te elimineren is gebaseerd op het gegeven dat humane leukemie cellen van patiënten met acute myeloïde leukemie (AML) en chronische myeloïde leukemie (CML), maar ook cellen van het voorstadium van AML, het myelodysplastisch syndroom en normale hematopoïetische stam cellen uitgroeien in dit muizen model. Het immuun deficiënte muizen model is de gouden standaard voor het bestuderen van de overleving van leukemie (stam) cellen. Dit muizen model is momenteel ook het geaccepteerde model om *in vivo* vast te stellen of er een effect van de modulatie van een gen of een nieuwe therapie is op overleving van leukemische en normale hematopoïetische (stam) cellen door middel van het uitvoeren van een tweede transplantatie of een cel verdunning experiment.

#### Globale experimentele aanpak (Figuur 1 Bijlage 3)

- a) De muizen worden bestraald om de muizenbeenmergcellen te elimineren en ruimte in het beenmerg te creëren voor de humane leukemie en humane normale hematopoïetische cellen.
- b) 1-7 dagen later krijgen de muizen humane leukemie (of normaal beenmerg) cellen (subcutaan, intraveneus of intrabeenmerg) ingespoten (cellijnen, cellen van patiënten of van gezonde donoren al dan niet gemoduleerd in gen expressie).
- c) De uitgroei van de leukemie of de normale cellen zal worden gevolgd door regelmatig de tumor omvang te meten (subcutane groei), visuele inspectie (imaging) en/of meerdere malen een bloedanalyse.
- d) Enkele dagen tot weken na de injectie van de leukemie (of normale) cellen krijgen de dieren wel of geen therapie volgens een vooraf bepaald schema. Deze therapie kan een monotherapie of een combinatie therapie zijn en kan bestaan uit chemotherapie, "targeted" therapie, "small molecules", differentiatie therapie, immuuntherapie met monoclonale antilichamen of immuuntherapie met cellulaire therapie. We zullen concentraties en toediening schema's hanteren zoals deze zijn beschreven in de literatuur voor de

desbetreffende therapie of die bepaald zijn door de experimenten in bijlage 2.

- e) Enige tijd later (1-168 dagen) zullen de tumor omvang (in het geval van subcutane injectie) en de hoeveelheid en karakteristieken van de humane cellen in het beenmerg, de milt, de lever en het bloed van de muis bekeken worden. De subcutane tumor zal om de dag met een schuifmaat worden gemeten. De hoeveelheid humane cellen in het bloed, beenmerg, milt en lever zullen bepaald worden met behulp van flow cytometrie. Cellen zullen worden verwijderd uit de verschillende organen en aangekleurd met antilichamen gericht tegen oa humaan CD45 (humane leukemie), CD34 (stamcellen/progenitoren), CD33/CD13 (myeloïde cellen), CD3 (T cellen), CD19 (B cellen), CD14 (monocyten).
- f) Na 140-168 dagen zullen de cellen vanuit de milt en het beenmerg van de eerste muizen (1<sup>e</sup> transplantatie) voor elke conditie bij elkaar gedaan worden en zullen gelijke hoeveelheden van de humane cellen in 2<sup>de</sup> muizen worden geïnjecteerd. Dit om te testen wat het effect van gen modulatie en therapie op LSC en normale HSC heeft. Enige tijd later (1-168 dagen) zullen weer de hoeveelheid en karakteristieken van de humane cellen in het beenmerg, de milt, de lever en het bloed van deze 2<sup>e</sup> muizen bekeken worden. De hoeveelheid en karakteristieken van de humane cellen in het bloed, beenmerg, milt en lever zullen bepaald worden met behulp van flow cytometrie.



**Figuur 1:** De muizen zullen bestraald worden en vervolgens zullen de leukemie cellen van een patiënt intraveneus geïnjecteerd worden. Nieuwe therapie (in combinatie met bijvoorbeeld chemotherapie of differentiatie therapie) zal geïnjecteerd worden en vervolgens zal de uitgroei van de leukemie en de normale cellen bestudeerd worden in beenmerg, milt, bloed en lever. De humane leukemie zal vanuit de 1<sup>st</sup>e getransplanteerde muizen in 2<sup>de</sup> muizen geïnjecteerd worden (een re-transplantatie) en vervolgens zal weer de uitgroei van de leukemie en de normale cellen bestudeerd worden in beenmerg, milt, bloed en lever om het effect op uitgroei van leukemie en normale (stam) cellen te bepalen.

### Primaire uitkomstparameters

#### Na gebruik van leukemie cellijnen

Leukemie cellijnen kunnen gebruikt worden om na subcutane injectie het effect van gen expressie modulatie of een therapie te bestuderen. De omvang van de tumor (leukemie subcutaan ingespoten vormt een subcutane tumor) zal op verschillende tijdstippen met een digitale schuifmaat worden gemeten en de omvang is een parameter voor tumor groei. Zodra het humane eindpunt bereikt is (2cm<sup>3</sup>) zal de muis uit het experiment worden gehaald.

#### Na gebruik van patiënt leukemie cellen

De remming (of verhoging) van leukemie of normale hematopoïetische cel groei in het bloed, beenmerg, de milt en de lever van de muizen zal gebruikt worden als parameter voor het effect van de modulatie van gen expressie (genen en microRNAs) en/of het toedienen van een therapie. Alle cellen uit het beenmerg, de milt en de lever van de muis worden verwijderd en geanalyseerd voor aanwezigheid van cellen met humaan CD45 en CD33 en muis CD45 op het cel oppervlakte van de cellen. Dit zal aangeven hoeveel cellen afkomstig zijn van de patiënt en hoeveel van de muis. De expressie van leukemie geassocieerde kenmerken (immunofenotypisch en/of moleculair) zal bekeken worden om te ontdekken of de cellen die uitgegroeid zijn in de immuun deficiënte muizen normaal of leukemisch zijn. Het percentage "uitgroei" (totale hoeveelheid humane cellen/totale hoeveelheid cellen x100) zal bepaald worden maar ook de absolute aantallen van humane en muis cellen in het beenmerg/milt/lever. Het meten van absolute aantallen leukemie cellen is essentieel omdat de hoeveelheid muisencellen die zich weer kunnen ontwikkelen in het beenmerg van de muis sterk afhangt van de hoeveelheid leukemie die gevormd wordt. Hoe meer leukemie hoe minder muisencellen. Dit is ook wat gezien wordt in leukemie patiënten waarbij de leukemie de ontwikkeling van normale hematopoïetische cellen remt. Ook resulteert therapie vaak in toename van dode cellen die opgeruimd worden uit het muizenbeenmerg en verdwijnen.

Naast het bestuderen van de modulatie van uitgroei van de totale leukemie willen we de inhibitie of verhoging van overleving van LSCs en leukemie initiërende cellen bestuderen. Om LSCs of leukemie initiërende cellen aan te tonen zullen we een verdunningsexperiment en/of een re-transplantatie doen. In een verdunningsexperiment worden verschillende hoeveelheden van leukemiecellen ingespoten en vanuit de minimale hoeveelheid cellen waarbij uitgroei plaatsvindt wordt het aantal LSCs in de totale leukemie berekend. Met dit experiment kan gekeken worden wat het effect van modulatie van gen expressie of een therapie op de overleving van het aantal LSCs is. Ook een re-transplantatie kan laten zien of de modulatie van gen expressie of een therapie effect heeft op de overleving van LSCs en leukemie initiërende cellen. Bij een re-transplantatie worden de beenmergcellen vanuit getransplanteerde muizen (1<sup>e</sup> transplantatie) waarbij de reconstitutie van humane cellen heeft plaatsgevonden ingespoten (2<sup>e</sup> transplantatie) in een 2<sup>de</sup> muis. De remming (of verhoging) van leukemie groei in het beenmerg, de milt en de lever van de muizen wordt gebruikt als parameter voor het effect van de modulatie van gen expressie (genen en microRNAs) en/of van de therapie op de overleving van LSCs. Alle cellen zullen na de 2<sup>de</sup> transplantatie worden verwijderd uit het bloed, het beenmerg, de milt en de lever van de muis en geanalyseerd voor aanwezigheid van humane CD45 en CD33 en muis CD45 op het cel oppervlakte van de cellen. Dit geeft aan of de cellen afkomstig zijn van de patiënt of van de muis.

#### *Detecteren van humane cellen in het bloed gedurende het experiment*

Naast regelmatige bloedafnames en bepaling van de hoeveelheid humane cellen in het bloed zullen we de leukemie cellen ook markeren met luciferase of een fluorescerend label voordat ze geïnjecteerd worden in de muis. De uitgroei van de leukemie cellen kan dan gevolgd worden met bioluminescentie of fluorescentie met behulp van "imaging" van de muizen. De muizen worden bij het meten van luciferase activiteit (gekoppeld aan de humane cellen) onder narcose ingespoten met een luciferase substraat en gescand.

Naast het bepalen van de overleving van de humane cellen in de muis zullen de leukemie cellen die uitgegroeid zijn in sommige experimenten geanalyseerd worden voor aanwezigheid van genetische afwijkingen (door middel van exome sequencing), gen expressie (door middel van RNA sequencing) en immunofenotype (door middel van flow cytometry).

---

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

---

#### *Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen.*

Het betreft experimenten waarbij 6-8 weken oude immuun deficiënte muizen worden bestraald en waarin vervolgens een dag later leukemie cellijnen subcutaan of intraveneus en humane primaire leukemie cellen of normale hematopoietische cellen intraveneus of intrabeenmerg worden ingespoten.

#### *1. De identificatie van kenmerken (genen) die een rol spelen bij leukemie initiatie, overleving van leukemie (stam) cellen en normale (stam) cellen, therapie gevoeligheid en differentiatie.*

Dit deel van de dierproef heeft als doel om te bepalen of modulatie van gen expressie (van de door ons geïdentificeerde factoren) invloed heeft op leukemie initiatie, overleving van leukemie (stam) cellen en normale (stam) cellen, therapie gevoeligheid en cel differentiatie.

#### A: Gebruik van leukemie cellijnen

We zullen leukemie cellijnen subcutaan injecteren en het effect van gen expressie modulatie op de groei snelheid van de tumor meten door middel van het meten van de omvang van de tumor (leukemie subcutaan ingespoten vormt een subcutane tumor). De subcutane tumor zal op verschillende tijdstippen met een digitale schuifmaat worden gemeten en de omvang is een parameter voor tumor groei.

#### B. Gebruik patiënten cellen in een eerste transplantatie.

Na injectie van de leukemie cellen die wel of niet gemoduleerd zijn in gen expressie zal uiteindelijk het percentage humane cellen (of absolute aantallen cellen) wat aanwezig is in de muis aan het eind van het experiment bepaald worden. Hiermee kan bepaald worden of de modulatie van dat gen effect heeft gehad op leukemie groei/initiatie. De expressie van bepaalde membraan eiwitten (bijvoorbeeld CD11b, CD14 en CD15) op de cellen geeft aan of de cellen gedifferentieerd zijn. Het effect op de overleving van leukemie initiërende cellen en LSCs kan op twee manieren bepaald worden: verdunningsexperiment en een 2<sup>de</sup> transplantatie. Leukemie cellen (soms opgezuiverd vanuit een heterogene populatie van AML cellen) wel of niet *in vitro* gemoduleerd in gen expressie zullen (in verschillende hoeveelheden of in 1 bepaalde hoeveelheid) worden geïnjecteerd (intraveneus of intra-beenmerg) in de muizen. Als een verdunningsexperiment plaats vindt kan vanuit de hoeveelheid cellen waarbij uitgroei plaatsvindt kan het aantal leukemie initiërende cellen (LSCs) berekend worden (L-Calcul Software, StemCell Technologies). Modulatie van gen expressie kan effect hebben op

de hoeveelheid cellen die nog in staat zijn om uitgroei van de leukemie te bewerkstelligen en met deze assay kan dus bepaald worden of de modulatie van gen expressie invloed heeft op de overleving van de leukemie en de LSCs.

### C. Het effect van gen modulatie op overleving van LSCs door middel van een 2<sup>e</sup> transplantatie.

Om LSCs aan te tonen zal een re-transplantatie experiment worden uitgevoerd waarbij de beenmergcellen vanuit een 1<sup>ste</sup> getransplanteerde muis, waarbij reconstitutie van humane cellen heeft plaatsgevonden, verzameld worden en geïnjecteerd in een 2<sup>de</sup> muis. In deze tweede muis zal een LSC leukemie geven en een gezonde stamcel uitgroei van gezonde bloedcellen. Als de controle muizen hun humaan eindpunt bereiken zullen zowel de controle als de met gen gemoduleerde leukemie cellen ingespoten muizen opgeofferd en getest worden voor aanwezigheid van leukemie.

## *2. Het preklinisch testen van de effectiviteit van therapie om leukemie (subpopulaties en stamcellen) te elimineren*

### Therapie testen

Dit deel van de dierproef heeft als doel om te bepalen of nieuwe therapie invloed heeft op leukemie initiatie, overleving van leukemie (stam) cellen en normale (stam) cellen, therapie gevoeligheid en differentiatie. Leukemie of normale cellen zullen geïnjecteerd worden in de muizen en vervolgens zullen de dieren een mono- of combinatie therapie toegediend krijgen. De gekozen therapeutische aanpak zal afhangen van het geïdentificeerde (en *in vitro* effectief bevonden) therapie doelwit gen. Afhankelijk van het middel wordt dit subcutaan, intraperitoneaal of intraveneus een aantal keren (maximaal vijf maal op aansluitende dagen) toegediend. Als het middel bekend is zal dit volgens doseringen en schema's die in de literatuur bekend zijn als effectieve en getolereerde doseringen worden toegediend. Als het nieuwe behandelingen zijn die nog nooit in een muis zijn getest voor toxiciteit en dosering bepaling zullen we een pilot experiment gaan uitvoeren met verschillende concentraties van het middel (bijlage 2). De therapie zal als monotherapie of in combinatie worden toegediend. In de meeste experimenten zal dit een combinatie met chemotherapie (bijvoorbeeld cytarabine en doxorubicin/daunorubicin) of differentiatie therapie (bijvoorbeeld all trans retinoic acid, ATRA) zijn. We verwachten maximaal 10 therapie strategieën te ontdekken en te testen in het muizen model in de 5 jaar dat het project zal lopen.

De combinatie met chemotherapie: We zullen in de meeste experimenten met chemotherapie een schema van toediening aanhouden waarbij cytarabine voor een aantal dagen wordt toegediend (intraperitoneaal of intraveneus) en waarbij dit in de eerste dagen gecombineerd wordt met een anthracycline, bijvoorbeeld doxorubicin of daunorubicin (intraperitoneaal of intraveneus). Dit schema hebben we in het verleden gebruikt en is beschreven in een publicatie [2]. Als er na 140-168 dagen leukemie (of normale uitgroei) wordt vastgesteld in het beenmerg of de milt van de muis zullen deze cellen ge-re-transplanteerd worden in een 2<sup>e</sup> recipiënt muis. Na subcutane injectie van leukemie cellen zal ditzelfde schema van chemotherapie behandeling worden toegepast [2]. De behandeling van een subcutane tumor zal starten als de tumor zichtbaar begint te worden (50 mm<sup>3</sup>).

De combinatie met differentiatie therapie: Voor het toedienen van differentiatie therapie zoals bijvoorbeeld ATRA zullen (2-10 weken) na injectie van de leukemiecellen ATRA of controle pellets subcutaan geïmplementeerd worden onder lichte narcose en pijnstilling. De muizen zullen op de plek van inbreng (nek) geschoren worden en een kleine insertie krijgen. Vervolgens zal de pellet ingebracht worden met een holle naald en de insertie met een hechting worden gedicht. Na de inbreng van de pellets krijgen de dieren pijnstilling in het drinkwater.

Deze standaard therapie (chemotherapie of differentiatie therapie) zal al dan niet gecombineerd worden met therapeutische mogelijkheden die door ons ontdekt zijn in het lab. Dit kunnen therapieën zijn die gericht zijn tegen signaal transductie moleculen zoals "small molecules", recombinante eiwitten of oligonucleotides maar ook immuun therapie of differentiatie therapie. Het kan ook zijn dat we een membraan eiwit als therapeutisch doelwit identificeren en vervolgens immuuntherapie in de vorm van antilichamen of cellulaire therapie (bijvoorbeeld CART cellen) ontwikkelen en testen in het muizen model. De methoden, concentraties en frequentie van toediening van deze therapieën zal afhangen van de methoden beschreven in de literatuur. Voorbeelden van een anti-signalering (anti-demethylering) therapie in combinatie met ATRA en een antilichaam therapie zijn beschreven in twee publicaties [3, 4].

We zullen de leukemie cellen of de verschillende cel fracties (genetisch, epigenetisch of fenotypische gedefinieerd) soms een tag geven (dit kan een aminozuur tag, een fluorescerend label, een DNA tag of een reporter zijn) en deze fracties gecombineerd of als fractie injecteren in de muis.



We zullen het:

2A. Effect van de therapie op leukemie uitgroei in een 1<sup>e</sup> transplantatie bepalen

Na injectie van de leukemie cellen en behandeling van de muizen zullen we vanuit het percentage humane cellen (of absolute aantallen cellen) aanwezig in de muis aan het eind van het experiment bepalen of de therapie effect heeft gehad op leukemie groei/initiatie. De expressie van bepaalde membraan eiwitten (bijvoorbeeld CD11b, CD14 en CD15) op de cellen geeft aan of de cellen gedifferentieerd zijn.

2B Het effect van de therapie op LSC overleving bepalen met een 2<sup>e</sup> transplantatie

Om LSCs aan te tonen zal een re-transplantatie experiment worden uitgevoerd waarbij de beenmergcellen vanuit een 1<sup>ste</sup> getransplanteerde muis, waarbij reconstitutie van humane cellen heeft plaatsgevonden, verzameld worden en geïnjecteerd in een 2<sup>de</sup> muis. In deze tweede muis zal een LSC overleving leukemie geven en gezonde stamcel overleving uitgroei van gezonde bloedcellen. Als de controle muizen hun humaan eindpunt bereiken zullen zowel de controle als de met therapie behandelde muizen opgeofferd en getest worden voor aanwezigheid van leukemie.

Algemeen voor alle muizenproeven met patiënten cellen: De muizen krijgen twee weken voor injectie van de leukemiecellen antibiotica in hun drinkwater om infecties te voorkomen en houden dit drinkwater een week na injectie. Op dag 0 worden de cellen toegediend en wordt er vervolgens op verschillende tijdstippen gedurende het experiment veneus bloed afgenomen en het bloed beoordeeld met flow cytometry op de aanwezigheid van leukemie en normale humane cellen. Op dag 140-168 worden de muizen geofferd en wordt de aanwezigheid van leukemie en normale cellen beoordeeld door immuno-fenotypering van de cellen uit het beenmerg, de milt, het bloed en de lever (aanwezigheid van humaan CD45+ en CD33+ cellen voor "uitgroei", CD11b voor differentiatie, CD3 voor T cellen en CD19 voor B cellen). Mochten er voor dag 140-168 ziekte verschijnselen optreden (gewichtsverlies >15% voor drie dagen achter elkaar gemeten of meer dan 25% gemeten op 1 dag, malaise (afwijkend gedrag, minder poetsgedrag, gebochelde houding, isolatie uit de groep) dan worden de muizen eerder geofferd en post-mortem de aanwezigheid van leukemie en normale cellen beoordeeld.

[1] A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009; 23(11):2109-17.

[2] AML cells are differentially sensitive to chemotherapy treatment in a human xenograft model. *Blood*. 2013; 121(12):e90-7.

[3] Inhibition of the LSD1 (KDM1A) demethylase reactivates the all-trans-retinoic acid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2012; 18(4):605-11.

[4] Targeting CD123 in acute myeloid leukemia using a T-cell-directed dual-affinity retargeting platform. *Blood*. 2016;127(1):122-31.

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

We verwachten maximaal 10 genen/therapie mogelijkheden in vijf jaar te ontdekken en te willen testen in een immuun deficiënt muizenmodel. De gen modulatie in leukemie cellen zal zowel in leukemie cellijnen als patiënten materiaal worden bekeken. Het effect van gen modulatie en therapie in patiënten cellen zal bekeken worden op de totale leukemie groei maar ook op de LSCs. Het effect op LSC overleving zal bekeken worden met een verdunningsexperiment maar ook met een 2<sup>de</sup> transplantatie.

*1. Testen van het effect van de modulatie in expressie van genen op leukemie uitgroei en LSCs overleving*

A. Wij verwachten dat muizen die subcutaan ingespoten worden met leukemie cellen (cellijnen) met verhoogde of verlaagde gen expressie een remming/verhoging van de overleving van leukemie cel groei hebben van minstens 25%. In het verleden hebben we gezien dat de te verwachten standaard deviatie ongeveer 10% is. Bij een power van 80% ( $\beta = 20$ ,  $z_{\beta} = 0.84$ ) en een significantie van 0.05 ( $\alpha$ ) wordt het aantal muizen per groep:  $2 \times (z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2) = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 25^2 = 2.5$ . Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 3. Omdat de dieren op beide flanken worden ingespoten zou dit aantal minder kunnen zijn maar in het verleden hebben we gezien dat de tumoren soms verschillend groeien op de linker en de rechter flank. Bij subcutane groei zien we dat uitval van muizen niet plaatsvindt. Wij verwachten niet meer dan 1 experiment per jaar met een cellijn/subcutaan te gaan doen. Deze experimenten hebben twee groepen van muizen waarbij cellen (hoge en lage expressie van een gen) in verschillende hoeveelheden (4 concentraties) worden ingespoten in de muizen. Een experiment zal uit 8 groepen bestaan van n=3 dus een totaal van 24 muizen per experiment en een totaal van 5x24 is **120 muizen in 5 jaar**.

B. Uit de literatuur is bekend dat de muizen ingespoten met primaire leukemie cellen na 140-168 dagen leukemie hebben. Wij verwachten dat muizen die ingespoten zijn met verschillende concentraties van cellen met verhoogde of verlaagde gen expressie een remming of eliminatie van leukemie initiatie/groei hebben van minstens 20%. De verwachte standaard deviatie is ook hier weer 10%. Bij een power van 80% ( $\beta = 20$ ,  $z_\beta = 0.84$ ) en een significantie van 0.05 ( $\alpha$ ) wordt het aantal muizen per groep:  $2 \times (z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2))^2 = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 20^2 = 3.92$ . Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 4. Als er 4 dieren in een groep zitten kan het voorkomen dat er bij uitval van 1 van de muizen geen significante resultaten zijn en we nemen daarom altijd 5 dieren per groep. Dit geldt voor elke groep in deze 1st transplantatie experimenten (verduunningexperimenten). Uit de literatuur blijkt dat deze experimenten meestal met vijf cel concentraties worden uitgevoerd (met hoge en lage expressie van een gen) wat een totaal van 8 groepen muizen in 1 experiment geeft en een totaal van 50 muizen voor elk experiment. Wij verwachten (aan de hand van het aantal lopende en verwachte projecten) dat we 1 gen per jaar gaan testen en dat er rond de 4 (verduunning) experimenten (met 4 verschillende leukemie samples) moeten worden uitgevoerd om te bevestigen dat het gen betrokken is bij leukemie initiatie en groei. Dit zal dus een totaal van 20 experimenten met 50 muizen vereisen en een **totaal van 1000 muizen in 5 jaar** zijn.

Vanuit deze 1st transplantaties kunnen de cellen gere-transplanteerd worden in 2<sup>de</sup> muizen om het effect van gen modulatie op LSC overleving te bepalen.

C. Het retransplanteren in een 2<sup>e</sup> recipiënt muis zal grotere verschillen in humane uitgroei laten zien tussen de cellen met een hoge en een lage expressie dan de 1<sup>st</sup> transplantaties. Het is de verwachting dat uitgroei in 1<sup>ste</sup> transplantatie zeker in de gevallen van injectie van de hoogste concentraties cellen positief is en daarom zullen we alleen deze twee concentraties gebruiken voor 2<sup>de</sup> transplantaties. Wij verwachten hier minstens 25% verschillen in uitgroei met een SD van 10%. Bij een power van 80% ( $\beta = 20$ ,  $z_\beta = 0.84$ ) en een significantie van 0.05 ( $\alpha$ ) wordt het aantal muizen per groep:  $2 \times (z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2))^2 = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 25^2 = 2.54$ . Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 3 in de re-transplantatie. Als er 3 dieren in een groep zitten kan het voorkomen dat er bij uitval van 1 van de muizen geen significante resultaten zijn en we nemen daarom altijd 4 dieren per groep. De humane cellen zullen vanuit de verduunningsexperimenten (zie 1<sup>ste</sup> transplantatie) verzameld worden (2 groepen) en in muizen worden geïnjecteerd. Dit zullen dus 20 experimenten x 2 groepen is 40 muizen x n=4 een **totaal van 160 muizen zijn in 5 jaar**.

## 2. *Het preklinisch testen van de effectiviteit van therapie tegen leukemie (stam) cel uitgroei*

A. Wij verwachten dat muizen die leukemie hebben en vervolgens worden ingespoten met een mono of combinatie therapie een remming of eliminatie van leukemie initiatie/groei gaan geven van minstens 20%. De verwachte standaard deviatie is hier 10%. Bij een power van 80% ( $\beta = 20$ ,  $z_\beta = 0.84$ ) en een significantie van 0.05 ( $\alpha$ ) wordt het aantal muizen per groep:  $2 \times (z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2))^2 = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 20^2 = 3.92$ . Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 4. Als er 4 dieren in een groep zitten kan het voorkomen dat er bij uitval van 1 van de muizen geen significante resultaten zijn en we nemen daarom altijd 5 dieren per groep. Wij verwachten (aan de hand van het aantal lopende en het aantal verwachte projecten) dat we 2 verschillende therapieën per jaar gaan testen voor effect op leukemie initiatie en groei. Elke therapie zal met vijf verschillende leukemie samples en twee normale gezonde samples getest moeten worden om te kunnen concluderen dat de therapie op verschillende subtypes van leukemie een specifiek effect heeft. Dit geeft een totaal van 70 experimenten (10 medicijnen in 5 jaar in 5 verschillende leukemie monsters en 2 normale monsters). De experimenten bevatten meestal 4 groepen (controle muizen, 2 monotherapieën en de combinatie) wat een totaal van 20 muizen per experiment is en een totaal van **1400 muizen is voor 5 jaar voor een 1<sup>ste</sup> transplantatie**.

We verwachten dat we 2 therapieën in 5 jaar gaan testen voor het effect op het elimineren van getagde subpopulaties van cellen in 4 verschillende leukemie sample. Dit zal dus een totaal van 8 (2 medicijnen in 5 jaar in 4 verschillende leukemie monsters) experimenten zijn. De experimenten bevatten 2 groepen (controle muizen en de therapie) wat een totaal van 10 muizen per experiment is en een **totaal van 80 muizen is voor 5 jaar voor een 1<sup>ste</sup> transplantatie**.

B. Het retransplanteren in een 2<sup>e</sup> recipiënt muis zal grotere verschillen in humane uitgroei laten zien voor en na therapie dan de 1<sup>st</sup> transplantaties. Het is de verwachting dat uitgroei in 1<sup>ste</sup> transplantatie. Wij verwachten hier minstens 25% verschillen met een SD van 10%. Bij een power van 80% ( $\beta = 20$ ,  $z_\beta = 0.84$ ) en een significantie van 0.05 ( $\alpha$ ) wordt het aantal muizen per groep:  $2 \times (z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2))^2 = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 25^2 = 2.54$ . Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 3 in de re-transplantatie. Als er 3 dieren in een

groep zitten kan het voorkomen dat er bij uitval van 1 van de muizen geen significante resultaten zijn en we nemen daarom altijd 4 dieren per groep. Dit zullen dus 70 experimenten x 4 groepen x n=4 muizen en een totaal van **1120 muizen zijn voor 5 jaar** het eerste onderdeel en 8 experimenten x 2 groepen x n=4 muizen en een totaal van **64 muizen voor het tweede onderdeel** waarin we cellen met een tag voorzien.

## B. De dieren

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

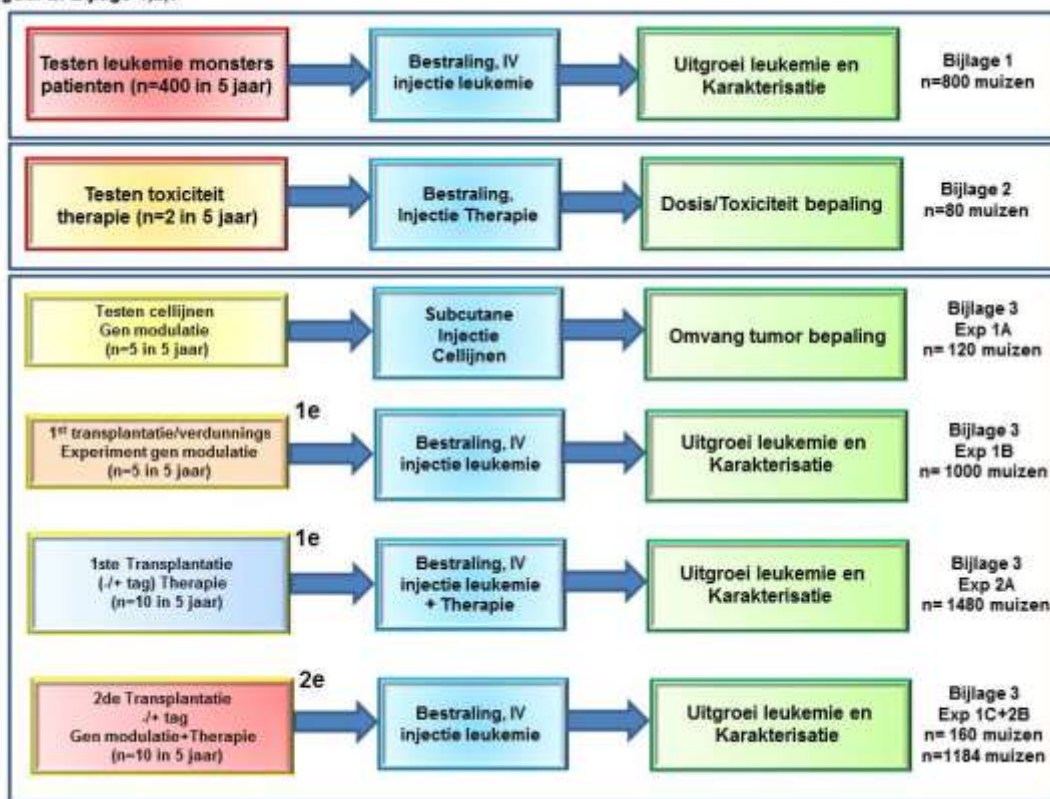
Diersoort: Immunodeficiënte muizen. We zullen het NOD/SCID/IL2 gamma chain (NSG) knock-out muizenmodel gebruiken of een immunodeficiënte muis geoptimaliseerd om ook de omgeving te humaniseren, bijvoorbeeld de NRG-SGM3 muis, de NOD.Cg-Kit<sup>W-41J</sup> Tyr<sup>+</sup> Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/ThomJ (NBSGW) muis, de NSG-Tg (hu-SCF), de MISTRG muis en het humane scaffold muizen model waarbij humane beenmerg scaffolds worden ingebracht. We gebruiken zowel mannetjes als de vrouwtjes muizen tussen de 6-10 weken oud.

Herkomst: De dieren zullen uit eigen fok verkregen worden of gekocht worden bij een erkende proefdier leverancier.

Geschatte aantallen: De totale aantallen muizen in dit deel van het project is 3944 muizen. De aantallen van de nodig voor de verschillende onderdelen staan beschreven in overwegingen en statische onderbouwing (onderdeel 1A-1C en 2A en 2B) en in Figuur 2 Bijlage 3).

Levensstadia: De muizen zullen gebruikt worden als ze 6-10 weken oud zijn.

Figuur 2: Bijlage 1,2,3



## 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:

*In vitro* experimenten in een reageerbuis worden niet als bewijs gezien voor een effect van de gen modulatie of de therapie op leukemie (stam)cellen in een organisme. Dit omdat het beenmerg van de leukemie patiënt met het daarbij behorende micromilieu in een *in vitro* situatie niet aanwezig is. De factoren geproduceerd door de stromale cellen van het beenmerg zijn van essentieel belang voor de uitgroei van stamcellen. Het is daardoor niet mogelijk om adequaat bewijs te vergaren met behulp van *in vitro* experimenten en er is daarom geen goed alternatief voor deze dierproeven. Het ontwikkelen van geneesmiddelen voor patiënten met leukemie wordt altijd gestart door onderzoek in een reageerbuisje maar zal dan vervolgens *in vivo* in de muis preklinisch getest moeten worden voordat het in de patiënt in een klinische studie gebruikt kan worden.

Vermindering: We hebben een aantal methoden/factoren geoptimaliseerd waardoor bij het doen van de experimenten het aantal proefdieren zo beperkt mogelijk blijft.

- Het gebruik van het immuun deficiënte muizen model laat de beste uitgroei van stamcel achtige cellen zien van de beschikbare muizenmodellen en zal daardoor het aantal benodigde dieren beperkt houden.
- Er is een verhoogd risico op uitval als gevolg van infecties door de immuundeficiëntie. Dit zullen we met barrière maatregelen proberen te voorkomen. De dieren zullen met steriele handschoenen worden gehanteerd en alle handeling vinden plaats onder laminaire flow condities waardoor uitval als gevolg van een infectie niet plaatsvindt. De dieren worden ook gehuisvest in individueel geventileerde kooien.
- De proefopzet is zodanig dat bij uitval van 1 dier in een groep de resultaten van de proef nog steeds significant zijn en de proef niet herhaald hoeft te worden.
- We zullen altijd de absolute aantallen leukemiecellen in het beenmerg van de muis bekijken (door het verwijderen van alle cellen uit het beenmerg). Dit voorkomt heterogeniteit van uitgroei veroorzaakt door de variatie in hoeveelheid muizencellen in het beenmerg maar ook in hoeveelheid opgeruimde dode cellen. Het minimaliseren van heterogeniteit zorgt er voor dat er minimale aantallen muizen in een groep gebruikt kunnen worden voor het experiment.
- Kleine hoeveelheden bloed (bloedmonsters) zullen tijdens de duur van het experiment van alle muizen genomen worden. Doordat we nu meerdere keren bloed afnemen vergaren we al resultaten tijdens het experiment.
- Veel medicijnen (of medicijnen die tot dezelfde groep behoren) zijn al getest op toxiciteit in het immuun deficiënte muizen model omdat dit muizenmodel wijdverbreid wordt gebruikt voor het ontdekken van therapie tegen allerlei tumoren. Dit zorgt er voor dat maar enkele nieuwe medicijnen getest hoeven te worden op maximaal tolereerbare dosis (MTD) (bijlage 2).
- We zullen zowel de mannetjes en de vrouwtjes muizen gebruiken waardoor alle geboren muizen gebruikt kunnen worden en geen afvoer plaats vindt.
- De groei van leukemie zal tijdens de proef gevolgd worden door de cellen te labelen met luciferase of een fluorescerend label in combinatie met imaging technologie. Resultaten over de groei van de tumor kan dus nu tijdens de proef worden verkregen en het doden van het dier is niet meer de enige manier om de tumor in het lichaam te bestuderen.

Verfijning: De noodzakelijke dierproeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in de muis. De kennis en expertise opgebouwd uit het kanker onderzoek in muizen met een defect immuunsysteem in ongekend groot en deze muis is dan ook uitermate geschikt om nieuwe behandelmethoden voor leukemie te bestuderen. We zullen de experimenten binnen dit project op een zodanige manier opzetten dat de dieren zo min mogelijk ongerief ondervinden tijdens het experiment. De dieren zullen goede huisvesting hebben en de uitvoering van de experimenten zal alleen gebeuren door bevoegd en bekwaam personeel. We hebben een aantal analisten met veel proefdierervaring in dienst. Dieren zullen in een eerder stadium dan het verkrijgen van matig ongerief of sterfte door de leukemie getermineerd worden, waarna de verdere analyses *in vitro* plaats vinden. Dit voorkomt onnodig lijden en ernstig ongerief voor de dieren. De dieren zullen in individueel geventileerde kooien worden gehuisvest wat de kans op infectie zal verkleinen. Ook krijgen alle dieren tijdens (een deel van) het experiment antibiotica in hun drinkwater om ongewenste infecties door het zwakke immuunsysteem te voorkomen.

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.

Gedurende het hele experiment zullen maatregelen genomen worden om de kans op pijn, lijden en angst bij de dieren tot een minimum te beperken.

- Dit zal bewerkstelligd worden door optimale huisvesting van de dieren en uitvoering van de experimenten door bekwaam personeel.
- De lengte van het experiment is zo gekozen dat de kans op ernstige ziekte als gevolg van de leukemie minimaal is, maar lang genoeg om leukemie te kunnen detecteren.
- Voor het toedienen van differentiatie therapie (bijvoorbeeld ATRA) of controle pellets zal een lichte narcose en pijnstilling worden toegediend. Na de inbreng van de pellets krijgen de dieren ook pijnstilling.
- Het meten van tumoren met een schuifmaat zal met twee personen plaatsvinden zodat dit snel en efficiënt gebeurt. Het humane eindpunt is duidelijk gedefinieerd zodat de muizen niet onnodig zullen lijden door het hebben van hele grote subcutane tumoren.
- Bloedafname gebeurt door middel van intraveneuze afname en zal maximaal 3x per week plaatsvinden hetgeen als een maximaal aantal beschouwd wordt waarbij geen pijn of lijden wordt veroorzaakt.
- Bij experimenten die met imaging worden gevolgd worden de dieren onder narcose, liggend op een verwarmd plateau, gemeten.

Bij het eindpunt van het experiment worden de dieren onder narcose gedood.

## 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 middel van gen expressie profilering hebben en zullen we genen en microRNAs identificeren die differentieel tot expressie komen tussen verschillende cel populaties in het leukemiebeenmerg. Deze door ons geïdentificeerde specifieke genen of mogelijke therapie doelwitten zullen we dan vervolgens karakteriseren voor hun rol in de overleving en therapie gevoeligheid van leukemie cellen. De door ons geïdentificeerde therapeutische mogelijkheden zullen we als monotherapie of combinatie therapie in de vorm van cytostatica, "targeted therapie", remmers van signaal transductie paden, modulatoren van microRNA expressie en immunotherapie testen voor hun werkzaamheid. De dierproeven uitgevoerd met deze nieuwe therapieën zijn nog niet eerder uitgevoerd. We hebben verschillende samenwerkingen lopen op het gebied van ontdekking van nieuwe therapie tegen leukemie maar deze samenwerkingen zijn op elkaar afgestemd zodat er geen onnodige duplicatie optreedt. Of dezelfde therapieën getest worden door andere laboratoria zullen we nauwlettend in de gaten houden door het "up to date" blijven met gepubliceerde data maar ook door het bezoeken van congressen waar onderzoeksgroepen die vergelijkbaar werk doen aanwezig zullen zijn. De patiënten samples die wij in de experimenten testen zijn uniek.

## 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.

Voor het toedienen van ATRA of controle pellets zal een lichte narcose en pijnstilling worden toegediend. Na de inbreng van de pellets krijgen de dieren pijnstilling in het drinkwater. Tijdens het herstel van de implantatie van de pellets liggen de dieren op een verwarmde mat. Bij experimenten die met imaging worden gevolgd worden de dieren onder narcose, liggend op een verwarmd plateau, gemeten. Bij het eindpunt van het experiment worden de dieren onder narcose gedood.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het bestralen van de dieren kan er voor zorgen dat de dieren een lichte terugval in gewicht krijgen. Dit zal leiden tot licht ongerief. De toediening (intraveneus) van de leukemie cellen is eenmalig waardoor het ongerief beperkt blijft. Euthanasie onder narcose en het wegemen van de dieren wordt als licht ongerief ingeschat. De dieren ingespoten met leukemie cellen kunnen anemie ontwikkelen wat enkele dagen kan duren. Dit kan matig ongerief geven voor maximaal twee dagen. In het verleden hebben we waargenomen dat dit bij ongeveer 5% van de dieren plaatsvindt. Omdat immuundeficiëntie dieren gebruikt worden is er een verhoogd risico op infecties wat het welzijn van de dieren kan aantasten. Ervaring uit het verleden leert dat uitval- als gevolg van een infectie niet voorkomt.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak van de dip (gewichtsverlies) na de bestraling en het inbrengen van de ATRA/PBS pellets of de behandeling met chemotherapie wordt vaak veroorzaakt door algehele malaise en het niet eten van de dieren met als mogelijke oorzaak het ziek voelen. De anemie wordt veroorzaakt doordat de dieren leukemie in het beenmerg en de milt krijgen.

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

Na de bestraling en het inbrengen van pellets of de behandeling met chemotherapie geven we het voer in de bak zodat de dieren makkelijkere toegang hebben tot het voedsel. Ook geven we het voedsel in pap vorm en geven we antibiotica en pijnstilling (zie boven) om de pijn te verminderen en de eetlust te verhogen.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De criteria voor humane eindpunten zijn als volgt:

Subcutane tumoren: Voor de groei van subcutane tumoren gebruiken we het verantwoorde eindpunt (volgens de Code of Practice Dierproeven in het Kankeronderzoek) van 10% van de het normale lichaamsgewicht. Dit is 2 cm<sup>3</sup>. De standaard weegfrequentie is 2-4x/week. Indien ziekteverschijnselen geconstateerd worden dan worden de dieren dagelijks gewogen.

Maximale systemische leukemiegroei: met behulp van imaging is geconstateerd dat het dier de maximale

tumorgroei (zit vol met leukemie) heeft bereikt.

Groei van leukemie in beenmerg/milt/lever en overschrijding ongerief: Mochten er voor dag 140-168 ziekteverschijnselen optreden (gewichtsverlies > 15% t.o.v. dag 1 voor drie opeenvolgende dagen of meer dan 20% in 1 dag, algehele malaise (afwijkend gedrag, afwijkende houding (kromming van de rug) minder poetsgedrag, afwijkende vacht (pilo-erectie), isolatie uit de groep) dan worden de muizen eerder getermineerd en post-mortem de mogelijke aanwezigheid van leukemie beoordeeld

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

In het geval van een subcutane tumorgroei is het 100% van de dieren die het humane eindpunt van 2 cm<sup>3</sup> haalt. In het geval van systemische leukemie groei is het afhankelijk van het patiënten materiaal of het humane eindpunt van 140-168 dagen gehaald wordt. Inspuiten van sommige (5% van de muizen) leukemie monsters (in sommige muizen) kan leiden tot ziekteverschijnselen eerder dan deze 140-168 dagen.

### 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.

| Exp. Handelingen   | Kwalificatie ongerief | Duur   |  |
|--|-----------------------|--|--|
| Transport naar bestralingsfaciliteit   | Licht                 | 10 minuten (100% muizen)   |  |
| Bestraling (subletale dosis)   | Licht                 | Enkele minuten (eenmalig) een week na de bestraling kan er een dip in gewicht optreden wat veroorzaakt wordt door een kortdurende afname van voedselintake/welbevinden (100% van de muizen). |  |
| Toediening van leukemie cellen   | Licht                 | Enkele minuten, Eenmalig (100% muizen)   |  |
| Toedienen therapie   | Licht                 | Enkele minuten, meermalig (75% van 1400 muizen=1050 en 50% van 80=40 dieren in Exp2A)  |  |
| Toediening intraperitoneaal of intraveneus van chemotherapie                       | Licht                 | Meerdere malen, 1 minuut (niet bekend hoeveel dieren maar verwacht maximaal 30% van 1400 dieren=420 dieren in Exp2A).  |  |
| Perifere bloedafname via de staart vene  | Licht                 | Meerdere malen maar 1 keer in de twee weken voor een maximaal aantal keren van 5. Duur is 5 minuten (100% van de dieren)   |  |
| Zodra perifere bloedafname via staart venen niet meer gaat; overgang naar wangprik | Matig                 | Meerdere malen maar 1 keer in de twee weken voor een maximaal aantal keren van 3. Duur is 5 minuten.   |  |
| Inbrengen van ATRA pellets   | Licht                 | Eenmalig 10 minuten (niet bekend hoeveel dieren maar verwacht maximaal 30% van 1400 dieren=420 dieren in Exp2A).   |  |
| Toedienen luciferase en imaging  | Licht                 | Eenmalig 5 minuten   |  |
| Metten van een subcutane tumor   | Licht                 | 1 minuut meerdere malen (3% van de dieren, 120 van de 3584 in Exp1A)   |  |
| Leukemie vorming-anaemie   | Matig                 | Maximaal 2 dagen in 5% van de dieren.  |  |
| Lichte narcose toedienen   | Licht                 | Eenmalig, 1 minuut (niet bekend hoeveel dieren maar verwacht maximaal 30% van 1400 dieren=420 dieren in Exp2A).  |  |
| Wegen  | Licht                 | Meerdere malen, minuten (100% van de dieren)   |  |
| Doden van de dieren  | Licht                 | Onder anesthesie, enkele minuten (eenmalig)  |  |

De hoogste classificatie van ongerief zal matig zijn voor 5% van de muizen. Het totale cumulatieve ongerief zal matig zijn voor alle muizen.

### 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 einde van het experiment worden de dieren gedood om post mortem de leukemie die in de dieren zit te analyseren |
| Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?                                   |
| <input type="checkbox"/> Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> Ja   |



# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:  
*NVWA nummer 11400*
2. Titel van het project:  
*De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam)cellen*
3. Titel van de NTS:  
*De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam)cellen*
4. Type aanvraag:  
*Nieuwe aanvraag projectvergunning*
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: *30-11-2016*
  - aanvraag compleet: *30-11-2016*
  - in vergadering besproken: *13-12-2016*
  - anderszins behandeld: *n.v.t.*
  - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
  - aanpassing aanvraag: *03-01-2017*
  - advies aan CCD: *27-01-2017*
7. Afstemming IvD
  - Datum advies IvD: *30-11-2016*
  - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

### Vraagronde 1

- Datum: *15-12-2016*
- Strekking gestelde vragen: *Enkele tekstuele opmerkingen bij de NTS. De getallen kloppend maken in alle delen van de aanvraag. Check nog even de spelling. Waarom en wanneer kiest men een bepaalde therapie? Graag ziet de DEC hier meer uitleg over. Graag ook de in vitro en ex vivo experimenten noemen en toelichten. Graag nog toevoegen aan het ongeriefschema: doden van de dieren onder anesthesie, dit is licht ongerief.*
- Datum antwoord: *03-01-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

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

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

1. *Is het project vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. *n.v.t*

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

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

*Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: *n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

### **Belangen en waarden**

4. *Het directe doel van deze studie is het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie(stam)cellen. Om dit doel te bereiken zal men genen testen op hun betrokkenheid bij leukemie initiatie, therapie gevoeligheid, proliferatie, "zelf-vernieuwing" en differentiatie in een immuundeficiënt muismodel. Vervolgens zal men therapieën, gericht tegen deze genen/signalerings routes, in mono- of combinatie therapie preklinisch testen op hun effectiviteit in het doden van leukemiecellen.*

*Het uiteindelijke doel is om een effectief geneesmiddel en/of therapeutische strategie te ontwikkelen om leukemiecellen in leukemiepatiënten te elimineren en de terugkeer van de leukemie te voorkomen. Deze geneesmiddelen/therapeutische strategieën zullen gericht zijn tegen leukemiecellen die ongevoelig zijn voor de huidige gebruikte therapieën en zullen als mono- of combinatietherapie gericht zijn tegen het elimineren van alle leukemie cellen in de patiënt. Deze nieuwe geneesmiddelen/therapeutische strategieën zullen bijdragen aan betere overlevingskansen voor leukemiepatiënten.*

*Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

*De belangrijkste belanghebbenden in dit project, dat gericht is op de ontwikkeling van therapeutische strategieën voor de behandeling van leukemie, zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.*

*De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van therapeutische strategieën voor de behandeling van leukemie.*

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: *n.v.t.*

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn.

*Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er samengewerkt met de andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

*De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. Deze inzichten kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling voor leukemiepatiënten. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de logische opbouw van het onderzoek.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

*Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.*

10. *De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.*
11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

*Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.*

*De dieren ondervinden licht ongerief als gevolg van chemotherapie behandeling, bestraling, toediening injecties, operatie onder narcose, transport, wegen, imaging en doden van de dieren. Matig ongerief wordt bij 5% van de dieren verwacht als gevolg van leukemie. Bij de rest van de dieren zal het experiment beëindigd worden voordat de dieren matig ongerief ervaren van de leukemie. De bloedafname zal licht (type dierproef 1 en 2) tot maximaal matig (type dierproef 3) ongerief veroorzaken. Bij de dieren in type dierproef 2 zal een nieuwe therapie uitgetest worden om de toxiciteit te bepalen. De verwachting is dat dit gepaard zal gaan met maximaal matig ongerief, maar er is een kans bij 25% van deze dieren (n=20) op kortdurend ernstig ongerief vanwege bijwerkingen.*

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren operaties ondergaan. Daarnaast zullen de dieren leukemie ontwikkelen, wat kan leiden tot maximaal matig ongerief. Bovendien kunnen de dieren ongerief ondervinden van de bloedafname en bijwerkingen.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken.

*De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht of algehele malaise. Men verwacht in 5% de dieren de humane eindpunten toe te passen als gevolg van de zich ontwikkelende leukemie. Bij 25% van de dieren uit type dierproef 2 verwacht men de humane eindpunten toe te passen, als gevolg van toediening van een bepaalde dosering van de therapie. Voor de tumorgroei zal men de humane eindpunten volgens de Code of Practice voor kankeronderzoek toepassen.*

### **3V's**

14. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

*Het gebruik van dieren is nodig omdat er geen alternatieve methoden beschikbaar zijn waarmee men deze complexe processen, welke plaatsvinden in een organisme (de overleving van de gezonde cellen, herstel en ziekte), kan bestuderen. Pas wanneer in in vitro experimenten aangetoond is dat de toepassing van de therapie effectief blijkt zal een definitief bewijs gezocht worden in proefdierstudies. In het diermodel kunnen ook de bijwerkingen van de nieuwe therapie bekeken worden.*

*De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd.*

*De onderzoekers kiezen ervoor om muizen te gebruiken, omdat er muizen met een defect immuunsysteem beschikbaar zijn, waarin men humane leukemiecellen kan laten groeien. Men heeft bovendien veel ervaring met de muis als leukemiemodel, waardoor de nieuwe data goed te vergelijken is met eerdere resultaten.*

15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

*Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Het gebruik het meest geschikte muismodel, beide geslachten en ervaring met patiënten samples verminderd het aantal benodigde dieren.*

*Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 4824 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

16. 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.

*Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Verder zullen de dieren dagelijks beoordeeld worden en indien het dier het humaan eindpunt bereikt zal het uit de proef worden genomen. Alle experimenten zullen worden uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel.*

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt: *n.v.t.*

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

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

*Zowel vrouwelijke als mannelijke dieren zullen worden gebruikt.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).

*De dieren worden gedood om hun weefsel en (leukemie)cellen verder te kunnen analyseren.*

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

*Dit is niet mogelijk omdat er een post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.*

### **NTS**

21. *De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

*Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?*

*Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:*

*Rechtvaardigt de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van leukemie het gebruik van maximaal 4824 muizen in de dierproef die daarvan maximaal matig en in enkele gevallen ernstig ongerief ondervinden?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

*De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden licht tot matig, en in enkele gevallen ernstig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: veel voordeel omdat de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van nieuwe geneesmiddelen/therapeutische strategieën voor de behandeling van leukemie.*

*De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 4824 muizen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen/therapeutische strategieën om leukemiecellen in leukemiepatiënten te elimineren en de terugkeer van de leukemie te voorkomen is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen/therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie(stam)cellen. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling van patiënten met leukemie is afgewogen tegen het, als maximaal matig en in enkele gevallen ernstig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.*

*De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 4824 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

*(1) Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van leukemie.*

*(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 4824 muizen en het daarbij verwachte maximaal matige en in enkele gevallen ernstige ongerief.*

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

*De DEC adviseert de vergunning te verlenen.*

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

*Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.*

### 3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

*Er is geen dilemma geconstateerd.*

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 24 februari 2017 12:04  
**Aan:** [redacted]  
**Onderwerp:** RE: Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven, datum klopt niet

Beste [redacted]

Wij zullen ervoor zorgen dat de vergunning wordt aangepast naar de aangevraagde startdatum,

Vriendelijke groet,

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

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

---

**Van:** [redacted]  
**Verzonden:** vrijdag 24 februari 2017 11:09  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**Onderwerp:** FW: Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven, datum klopt niet  
**Urgentie:** Hoog

Geachte CCD,

We hebben helaas nog geen antwoord van u ontvangen over de datum bij protocol 850. Zie de mail hieronder. Graag horen we of dit aangepast kan worden. Alvast bedankt!

Met vriendelijke groet,  
[redacted]

---

**From:** [redacted]  
**Sent:** dinsdag 21 februari 2017 12:57  
**To:** 'info@zbo-ccd.nl'  
**Cc:** [redacted]  
**Subject:** FW: Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven, datum klopt niet

Geachte CCD,

De datum van de beslissing bij aanvraag AVD114002017850 van [redacted] klopt niet. We hebben in het aanvraagformulier aangegeven dat men op 1-6-2017 wil beginnen met het onderzoek, het moet dus 1-6-2017 t/m 31-5-2022 zijn (5 jaar). Er staat nu maart in plaats van juni, graag zien we dat dit aangepast wordt. Alvast bedankt!

Met vriendelijke groet,  
[redacted]

Ps. Ik heb de beslissing doorgestuurd naar de onderzoeker, het mailadres moet [redacted] zijn i.p.v. [redacted]

[redacted]  
Secretaris DEC en IVD VU-VUmc  
Arbo & Milieu



[REDACTED]

---

**From:** [REDACTED]  
**Sent:** maandag 20 februari 2017 16:00  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** Fwd: Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Ter info - [REDACTED]

Begin forwarded message:

**From:** Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
**Subject:** Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven  
**Date:** 20 February 2017 at 15:45:37 GMT+1  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Vriendelijk verwijs ik u naar de brief en de bijlagen.

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

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

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

T: 0900 2800028

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

[REDACTED]

[REDACTED] AMSTERDAM

[REDACTED]

**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  
AVD114002017850  
**Bijlagen**  
1

Datum 20 februari 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie ( stam )" met aanvraagnummer AVD114002017850. 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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie ( stam )" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de vergunning niet voor langer dan 5 jaar mag worden afgegeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Beoordeling achteraf**

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

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit/ VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 27

januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
20 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017850

### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Datum:**  
20 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017850

**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: **Vrije Universiteit Medisch Centrum**

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED] **AMSTERDAM**

Deelnemersnummer: **11400**

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, voor het project "De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie ( stam )" met aanvraagnummer AVD114002017850, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit/ VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 januari 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 januari 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 januari 2017, ontvangen op 31 januari 2017.

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017850

| Naam proef  | Diersoort/ Stam         | Aantal dieren | Ernst                                 | Opmerkingen |
|---|-------------------------|---------------|---------------------------------------|-------------|
| <b>3.4.4.1. Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.</b> |                         |               |                                       |             |
|   | Muizen (Mus musculus) / | 800           | 5%<br>Matig<br>95%<br>Licht           |             |
| <b>3.4.4.2. De bepaling van de maximaal getolereerde dosis van een nieuwe therapie in de immuundeficiënte muis</b>                  |                         |               |                                       |             |
|   | Muizen (Mus musculus) / | 80            | 25%<br>Ernstig<br>75%<br>Matig<br>75% |             |
| <b>3.4.4.3. Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen in de muis.</b>    |                         |               |                                       |             |
|   | Muizen (Mus musculus) / | 3.944         | 100%<br>Matig                         |             |

#### **Voorwaarden**

*Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017850

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**

AVD114002017850

## 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



**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017850

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

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

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

#### **Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, lid 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc)

Amsterdam

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

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

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

**Onze referentie**  
AVD114002017850

**Uw referentie**

**Bijlagen**

1

Datum 1 maart 2017

Betreft Correctie beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 31 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam)' met aanvraagnummer AVD114002017850.

**Beslissing**

Op 20 februari 2017 heeft u de beschikking en vergunning van uw aanvraag ontvangen. Op 21 februari 2017 heeft uw contactpersoon contact met ons opgenomen, omdat de ingangsdatum van de vergunning niet correct is. In de vergunning staat dat de vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, terwijl u het aanvraagformulier heeft aangegeven dat de geplande ingangsdatum van het project 1 juni 2017 is.

De aan u verstuurde vergunning bevat dus een kennelijke verschrijving en kan gecorrigeerd worden. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2022.

Voor het overige blijft het besluit van 31 januari 2017 ongewijzigd.

Deze brief dient u bij uw vergunning te voegen.

**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.

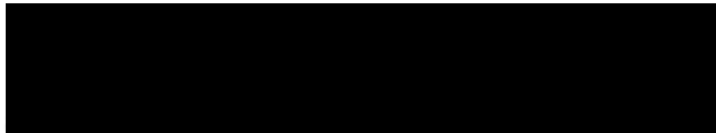
**Datum**  
1 maart 2017  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD114002017850

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

**Meer informatie**

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

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

| <b>Inventaris Wob-verzoek W17-07</b> |                             |                        |             |               |              |                          |               |               |             |   |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------|-------------|---|
|                                      |                             | <b>wordt verstrekt</b> |             |               |              | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |             |   |
| <b>nr.</b>                           | <b>document NTS 2017852</b> | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b> | <b>10.1.c</b>            | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |   |
| 1                                    | Aanvraagformulier           |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 2                                    | NTS                         | x                      |             |               |              |                          |               |               |             |   |
| 3                                    | Projectvoorstel             |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 4                                    | Bijlage animal procedure    |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 5                                    | Ontvangstbevestiging        |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 6                                    | DEC advies                  |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 7                                    | Advies CCD                  |                        | x           |               |              |                          |               |               |             | x |
| 8                                    | Beschikking en vergunning   |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

### Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in | 10800  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen           |  |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | Naam instelling of organisatie                                     | Universiteit Utrecht   |
|     |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde                | [REDACTED]   |
|     |   | KvK-nummer   | 30275924   |
|     |   | Straat en huisnummer   | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht   |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Postbus  | 12007  |
|     |   | Postcode en plaats   | 3501AA   Utrecht   |
|     |   | IBAN   | NL271INGB0000425267  |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer                              | Universiteit Utrecht   |
| 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  | Assistant professor  |
|     |   | 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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  | PhD student  |
|     |   | 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 - 3 - 2017 |
| Einddatum  | 1 - 9 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Relevance of Advanced Glycation Endproducts in feline Nutrition
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Relevantie van eiwit-suiker verbindingen in kattenvoeding
- 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 € 568 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

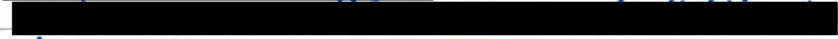
## 5 Checklist bijlagen


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


## 6 Ondertekening

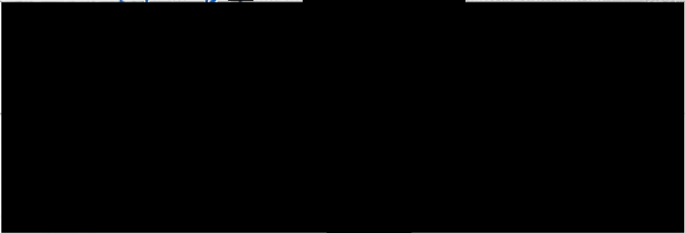
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats 

Datum *Litrecht*  
*31-01-2017* 

Handtekening 



## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

Age-related diseases, like renal disease and diabetes mellitus, have become common in cats, primarily because of the increase in longevity of domestic cats around the world<sup>1,2</sup>. Interestingly, many studies in humans and animals have shown a possible interrelation between chronic or age-related disease and dietary advanced glycation end products (AGEs)<sup>3</sup>. Dietary AGEs in humans are suspected to be involved





## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

Age-related diseases, like renal disease and diabetes mellitus, have become common in cats, primarily because of the increase in longevity of domestic cats around the world<sup>1,2</sup>. Interestingly, many studies in humans and animals have shown a possible interrelation between chronic or age-related disease and dietary advanced glycation end products (AGEs)<sup>3</sup>. Dietary AGEs in humans are suspected to be involved

in pathogenesis of chronic diseases associated with underlying inflammation<sup>4</sup>. It is assumed that this relation also exists in cats, as the pathophysiology of chronic diseases such as diabetes mellitus in cats and humans is similar<sup>2</sup>. AGEs are compounds of sugar moieties and proteins, and are formed during a non-enzymatic glycation reaction between a reducing sugar and a protein, known as the Maillard reaction<sup>5</sup>. Endogenous formation of AGEs can occur under physiological conditions, but retention in the body is limited by intrinsic detoxification<sup>6</sup>. In humans, food-derived AGEs are thought to be an important exogenous source of exposure. Several factors, including nutrient constituents, moisture, pH, cooking temperature, and length of food processing, influence the formation of dietary AGEs<sup>7</sup>. Results from a previous study by Rooijen et al.<sup>8</sup>, showed that extruded, canned and pelleted cat foods contain high amounts of specific AGEs. As the popularity of commercially prepared pet foods is increasing globally<sup>9</sup>, the percentage of domestic cats that are long-term exposed to a high exogenous AGEs intake increases as well. Thus the relevance of food-derived AGEs for cat health is of concern, such as possible effects of dietary AGEs on pathogenesis of chronic diseases.

Limited data are available on physiological AGEs formation and metabolism in cat. The endogenous formation is thought to occur as described in mice<sup>10</sup> and humans<sup>11</sup>. However, the domestic cat is known to have a unique carbohydrate metabolism, because of its carnivorous nature<sup>12</sup>. As such extrapolation of data from rodent studies may not be valid. Van Rooijen et al.<sup>13</sup>, performed a study in which the excretion of specific AGEs in cat urine was measured, and found data were extrapolated to bioavailability of those AGEs. Nevertheless, postprandial serum AGEs, dose response to dietary AGEs and effects on oxidative stress were not studied and remain unknown.

Since the domestic cat is an obligate carnivore which has a unique glucose metabolism<sup>12</sup>, the rate of endogenous Maillard reactions between feline serum albumin and reducing sugars in cats may differ from other animals including humans. Investigation in cats, using feline serum albumin for an in vitro study on AGEs formation, are needed for reliable conductance of the follow-up in vivo experiment (see Appendix) with cats, in which the influence of different dietary sugars on endogenous AGEs formation will be studied under controlled conditions. Moreover, the effect of dietary AGEs on postprandial serum AGEs, dose response to dietary AGEs and effects on oxidative stress will be studied as well (see Appendix). The main purpose of the studies in this proposal is to obtain basic knowledge on AGEs metabolism in cats, which is needed to perform further studies on possible pathogenic effects of AGEs in cats. The researchers have assured themselves that the data generated in this study are unique and the study is not previously performed.

<sup>1</sup>Saunders, A. B. (2012). The diagnosis and management of age-related veterinary cardiovascular disease. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 42(4), 655–68, vi.

<sup>2</sup>Hoenig, M. (2014). Carbohydrate metabolism and pathogenesis of diabetes mellitus in dogs and cats. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 121, 377–412.

<sup>3</sup>Mulder, D. J., Water, T. Van De, Lutgers, H. L., Graaff, R., Gans, R. O., Zijlstra, F., & Smit, A. J. (2006). Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 8(5), 523–35.

<sup>4</sup>Uribarri, J., Cai, W., Sandu, O., Peppas, M., Goldberg, T., & Vlassara, H. (2005). Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 461–466.

<sup>5</sup>Henle, T. (2005). Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids*, 29, 313–322. <http://doi.org/10.1007/s00726-005-0200-2>

<sup>6</sup>Thornalley, P. J., & Rabhani, N. (2014). Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry--a user's perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(2), 818–29.

<sup>7</sup>Poulsen, M. W., Hedegaard, R. V., Andersen, J. M., de Courten, B., Bügel, S., Nielsen, J., ... Dragsted, L. O. (2013). Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 60, 10–37.

<sup>8</sup>Rooijen, C. Van, Bosch, G., Poel, A. F. B. Van Der, Wierenga, P. a, Alexander, L., & Hendriks, W. H. (2014). Quantitation of Maillard Reaction Products in Commercially Available Pet Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

<sup>9</sup>Stepien, M., Mahony, L. O., Sullivan, A. O., Collier, J., Fraser, W. D., Gibney, J., ... Brennan, L. (2013). *Journal of nutritional science*, 25, 1–9.

- <sup>10</sup> Mastrocola, R., Nigro, D., Chiazza, F., Medana, C., Dal Bello, F., Boccuzzi, G., ... Aragno, M. (2016). Fructose-derived advanced glycation end-products drive lipogenesis and skeletal muscle reprogramming via SREBP-1c dysregulation in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 91, 224–235.
- <sup>11</sup> Bierhaus, A., Hofmann, M. A., Ziegler, R., & Nawroth, P. P. (1998). AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular Research*, 37(3), 586–600.
- <sup>12</sup> Schermerhorn, T. (2013). Normal glucose metabolism in carnivores overlaps with diabetes pathology in non-carnivores. *Frontiers in Endocrinology*, 4(DEC), 1–14.
- <sup>13</sup> Van Rooijen, C., Bosch, G., Butré, C. I., Van Der Poel, A. F. B., Wierenga, P. A., Alexander, L., & Hendriks, W. H. (2016). Urinary excretion of dietary Maillard reaction products in healthy adult female cats 1,2. *J. Anim. Sci*, 94, 185–195.

---

### 3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

Based on the possible involvement of AGEs in pathogenesis of chronic diseases, it is important to investigate these metabolites in cats. To be able to do so, it is of importance to obtain fundamental insight into AGEs metabolism, endogenous AGEs formation, exogenous AGEs absorption and AGEs excretion.

In this project there is a collaboration with the Animal Nutrition Group of Wageningen University. This research group has experience in AGEs research in companion animal feed. In addition, we have collaboration with the laboratory of Food Chemistry, Wageningen University and Research, in order to measure AGEs in our samples.

To achieve the main aim of this project, 2 main objectives are formulated;

Objective 1. To clarify factors involved in endogenous AGEs formation in domestic cats (e.g. type and level of dietary sugars).

Objective 2. To determine dose-response effects of dietary AGEs on absorption, excretion, and oxidative stress, in domestic cats.

---

### 3.3 Relevance

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

Scientific relevance: This study aims to contribute to a fundamental understanding of metabolism of AGEs and the influence of nutrition on their formation in cats. This knowledge is essential to be able to study the involvement of AGEs on development of chronic diseases in cats, as AGEs accumulation in the body is scientifically related to increased chronic disease risks in humans. The experiments are designed to collect information that is relevant to domestic cats, and may serve to be important in future studies on disease prevention and/or risk reduction in this species.

Social relevance: Nowadays, companion animals, such as cats and dogs, are increasingly being considered as family members. Regarding to their pet's health, pet owners are becoming more concerned and educated about enhancing quality of life and life expectancy for their pets. Pet food is one of the external influences on disease risk in cats. To ensure their best health and highest quality of life, it is important to understand possible risk factors involved in cat feeding, and attempt to reduce these risk factors. With the data from this research, pet owners can be better educated/advised on the preferred way to feed their animals for a long and healthy life.

---

### 3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

---

This project aims to elucidate the metabolism of AGEs in cats, in order to gain a better understanding on their possible role in development of chronic diseases. First, an *in vitro* study will be performed to obtain basic information on the sensitivity of Maillard reactions between dietary sugars and feline albumin and to assess a possible dose-response. Types of dietary sugars, for example glucose, fructose and high fructose corn syrup (HFCS), will be chosen based on its involvement in glycation reactions in the body, a possible association with pathogenesis of chronic diseases (e.g. diabetes mellitus and kidney diseases), and abundance in normal food. Secondly, AGEs formation under physiological condition will be studied *in vivo*, to estimate basal formation of endogenous AGEs as well as to assess dietary factors (reducing sugars) which accelerate endogenous AGEs formation (*in vivo* study 1). Lastly, the extend of absorption of exogenous AGEs via the gastrointestinal tract will be studied, as well as elimination kinetics of the metabolites formed out of these dietary AGEs (*in vivo* study 2). In order to be able to distinguish between endogenously- and exogenously-formed AGEs, the control groups in these studies will be fed with a diet that contains negligible amounts of dietary AGEs. AGEs difference in secretion between the two groups can then be attributed to exogenous AGEs absorption. For further clarification of endogenous versus exogenous AGEs metabolism, an overview of the background of the studies that will be performed to meet the objectives of this proposal is given in Figure 1 to 3.

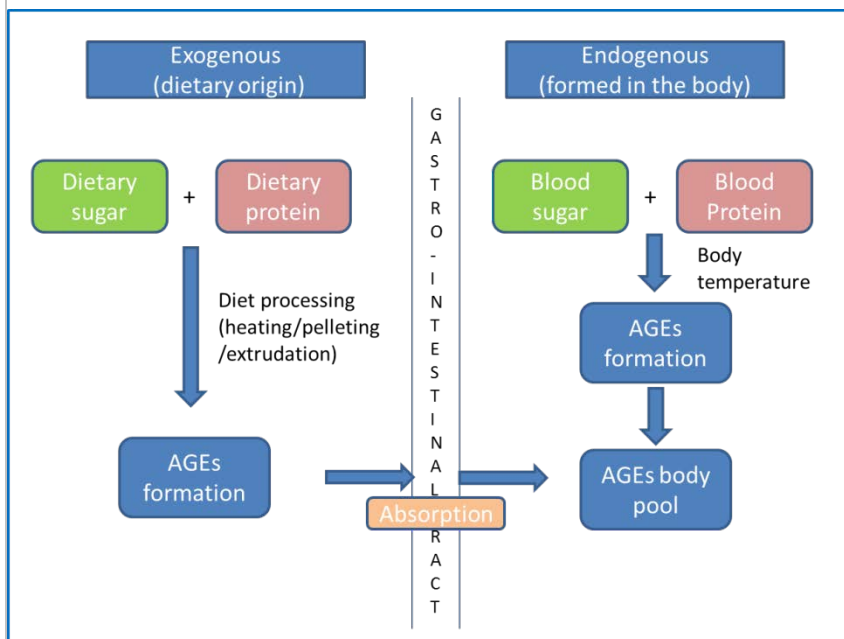


Figure 1: Overview of proposed exogenous versus endogenous metabolism of AGEs

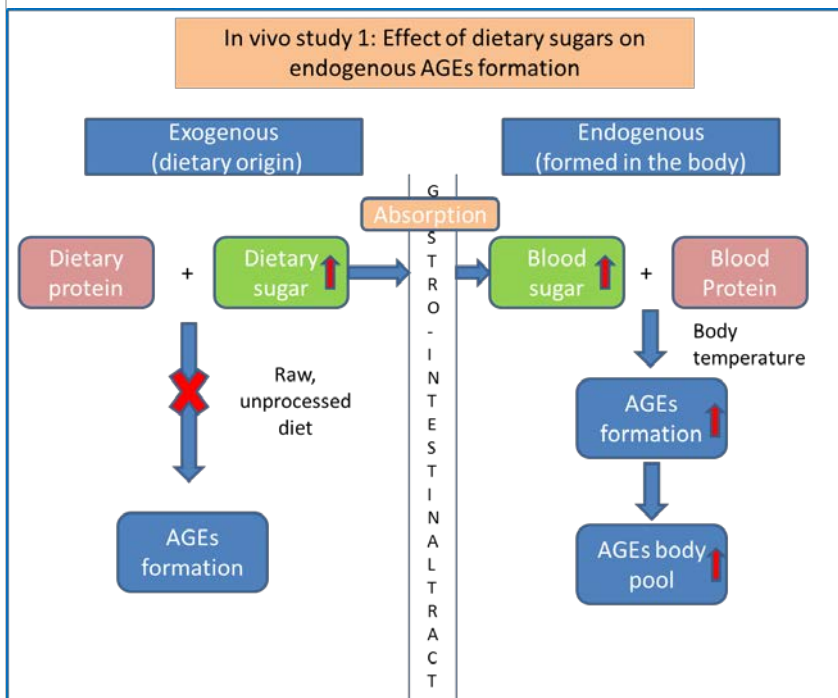


Figure 2: In vivo study 1: Effect of dietary sugars on endogenous AGEs formation

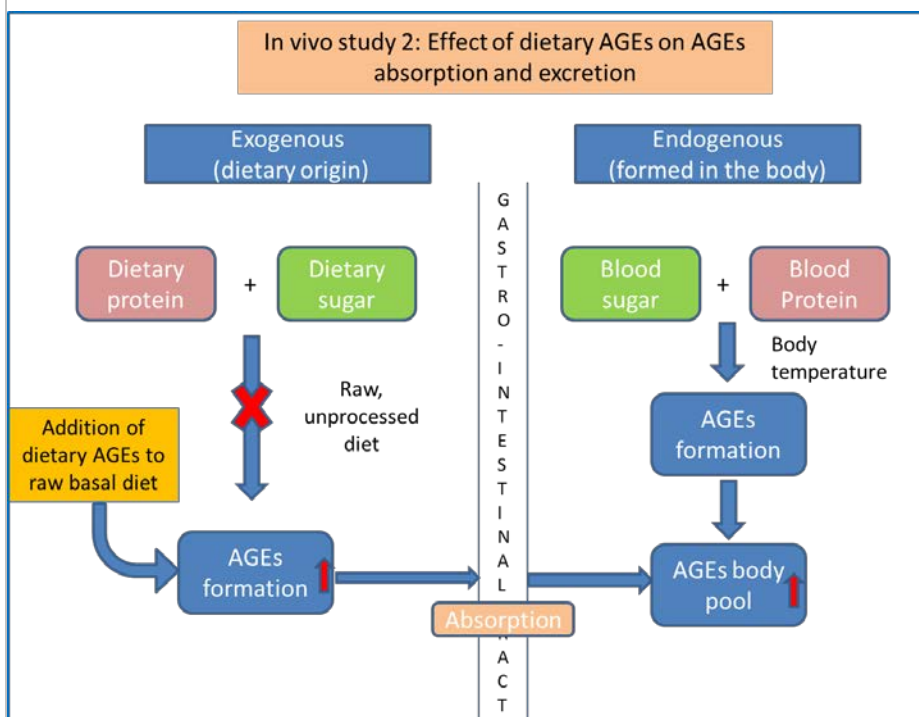


Figure 3: In vivo study 2: Effect of dietary AGEs on AGEs absorption and excretion

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

The project consists of 2 phases.

Phase 1. Research on endogenous AGEs formation; what is the basal level of endogenous formation of AGEs in cats and is it possible to accelerate endogenous AGEs formation by dietary sugars and/or increasing blood sugars (see Figure 2)? A preliminary in vitro study will be carried out first, to be able to

predict possible effects of adding sugars to the blood on endogenous AGEs formation. These data is needed to assess possible effective dosages needed in the follow-up controlled in vivo study with cats to increase endogenous AGEs formation via nutrition.

Phase 2. Effect of dietary exogenous AGEs, fed in different levels, on AGEs absorption, elimination kinetics, and oxidative stress parameters (see figure 3). In a controlled study with cats it will be researched in what extent different amounts of exogenous AGEs in the diet are absorbed and eliminated from the body. Selected blood parameters will be used to assess effects on blood AGEs levels and oxidative stress parameters. Data form the studies in Phase 1 is needed to be able to distinguish between endogenously formed AGEs and exogenously absorbed AGEs.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

For coherence of the studies within this project, please see Figure 1 to 3. The Phase 1 studies (in vitro preliminary study and in vivo study as described in Figure 2) aim to assess endogenous formation of AGEs in domestic cats, in which it is aimed to provide the extent of basal endogenous AGEs production and the role of dietary sugars in promoting endogenous AGEs via increasing blood sugars. A preliminary in vitro study will be performed to gain insights in the amount of sugars that may theoretically be needed to exert an effect. These data is needed to better predict amounts of sugars needed in the in vivo study to stimulate endogenous AGEs formation

In Phase 2, exogenous sources of AGEs will be fed to the cats in various levels to elucidate dose-response effects, and possible effects on oxidative stress responses (see Figure 3). Data from the Phase 1 studies is needed to distinguish effects of nutrition on endogenous formation vs. exogenous intake of AGEs, which is the reason why the Phase 1 studies will be performed before the Phase 2 study.

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

| Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 1             | Relevance of Advanced Glycation End-products in feline nutrition; <ul style="list-style-type: none"> <li>- In vitro study on the influence of exogenous sugars on endogenous AGEs formation in domestic cats blood</li> <li>- Controlled study on the influence of different dietary sugars on endogenous AGEs formation in cats.</li> <li>- Controlled study on the effect of different levels dietary AGEs on AGEs absorption, elimination and their influence on oxidative parameters in cats.</li> </ul> |
| 2             |  |
| 3             |  |
| 4             |  |
| 5             |  |
| 6             |  |
| 7             |  |
| 8             |  |
| 9             |  |
| 10            |  |



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10800
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Utrecht University
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 1             | Relevance of Advanced Glycation End-products in feline nutrition |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

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

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

This project, Relevance of Advanced Glycation End-products in feline nutrition, consists of 3 experiments which are:

1. In vitro study on the influence of exogenous sugars on endogenous AGEs formation in domestic cats blood (In vitro study).
2. Controlled study on the influence of different dietary sugars on endogenous AGEs formation in cats (In vivo study 1).
3. Controlled study on the effect of different levels dietary AGEs on AGEs absorption, elimination and their influence on oxidative parameters in cats (In vivo study 1).

Each experiment has its own the general design, which are described below.

**In vitro study:** The aim of this experiment is to clarify the rate of AGEs formation from serum albumin and reducing sugars under physiological condition. To obtain the result, blood samples will be collected from cats, after which feline serum albumin or red blood cells will be incubated with different types and concentrations of reducing sugars (e.g. glucose and fructose). It is hypothesized that type of sugar and its concentration may significantly affect the reaction rate between blood albumin and the added reducing sugars. Primary outcome parameters are AGEs level after incubation.

**In vivo study 1:** This experiment aims to elucidate endogenous formation of AGEs in cats and whether alteration in blood glucose level can influence the production. Accordingly, cats will be fed with a raw food (free of dietary AGEs) to give information on basal endogenous AGEs production, and this treatment will serve as the research control. Three different types of sugars (glucose, fructose and high fructose

corn syrup), were chosen based on their relevance for pathogenesis of chronic diseases, their ability to react in Maillard reactions, and their abundance in normal food. Selected sugars will be added on top of the basal raw food diet and each sugar addition serves as a test treatment. The needed dose of each sugar will be obtained from the results of our in vitro study. A control treatment and 3 test treatments will be studied in a Latin square design, to minimise variation and amount of cats needed. Our hypothesis is that an increasing amount dietary sugar leads to a rise in blood glucose, which may increase endogenous AGEs production, and that also the type of sugar used may influence production rate. The primary outcome parameters are serum AGEs and urinary AGEs.

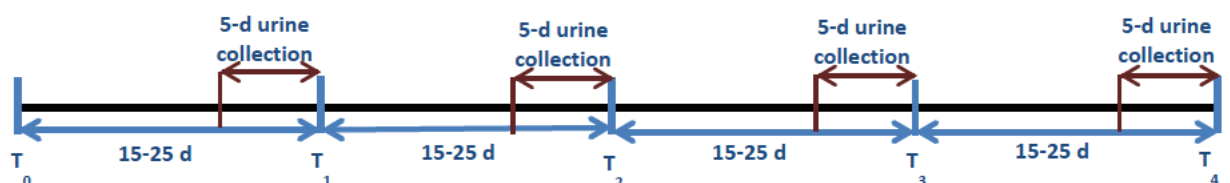
**In vivo study 2:** In a controlled study with cats it will be researched in what extent different amounts of exogenous AGEs in the diet are absorbed and eliminated from the body. Selected blood parameters will be used to assess effects on blood AGEs levels and oxidative stress parameters. A total of 3 levels of dietary AGEs will be studied, compared to a basal control diet. The control treatment and 3 test treatments will be studied in a Latin square design, to minimise variation and amount of cats needed. Our hypothesis is that an increasing amount dietary AGEs leads to a rise in blood AGEs content, urinary and faecal AGEs excretion, and may affect selected oxidative stress parameters. Primary outcome parameters are serum AGEs, urinary AGEs, faecal AGEs and oxidative stress biomarkers (e.g., sRAGE, TBARS, malondialdehyde).

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

**In vitro study:** Blood will be taken from cat only one time by a well-trained research technician or veterinarian.

**In vivo study 1 and 2:** Four parallel balanced Latin square designs will be performed. One Latin square will consist of 4 cats receiving 4 diets; a control treatment and 3 test treatments. Each food will be fed for 15-25 day, consisting of a 10-20 day of adaptation period (group housing) and 5-day urine collection period (individually housing in metabolic cages). Five-day urine collection period is optimal for increasing accuracy of results, which is based on a previous study with cats<sup>1</sup>. Blood samples will be taken at the start of the experiment and after each feeding period, with a maximum volume of 4 ml per sample. Blood will thus be taken as a total of 5 times per cat by a well-trained research technician or veterinarian.

Timeline for 1 cat (in vivo study 1 and 2)



<sup>1</sup>Hendriks, W. H., Wamberg, S., & Tarttelin, M. F. (1999). A metabolism cage for quantitative urine collection and accurate measurement of water balance in adult cats (*Felis catus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 82(2-3), 94-105.

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

**In vitro study:** Since there is a lack of evidence regarding AGEs formation and the influence of nutrition in carnivores, our sample size calculations were estimated based on recent knowledge in other species. A previously published in vitro study<sup>1</sup> described that 10 mg of bovine albumin was needed for glycation under physiological condition with a reducing sugar (e.g. glucose, fructose). Since the normal cat albumin concentration is estimated to be 2.5 – 3.9 mg/mL blood, approximately 3 ml of cat blood is needed to obtain 10 mg of feline albumin. For the in vitro study, it is aimed to test 5 different concentrations of 3 types of reducing sugars (15 in vitro runs) and a control treatment, in duplo (=2x15 + 2x5), leading to an estimation of 120 ml of feline blood needed (40 in vitro runs, with 3 ml feline blood



needed per run). It is estimated that the maximal volume of blood that can be drawn of a single cat without negative side effects is 10% of its total blood volume. The blood volume of a 4 kg cat is estimated to be 7% of its body weight, which is approximately 250 ml. This makes the maximal volume of blood that can be drawn per 4 kg cat equal to 25 ml. Twenty ml of blood will be drawn per cat from a total of 6 cats to obtain enough amount of feline serum albumin without causing adverse effect.

In vivo study 1: A Latin Square design will be used to minimise the number of cats. To determine sample-size, a power analysis was performed based on the result of a previous study in mice<sup>2</sup> with a power of 80%, an alpha of 0.05 and using serum AGEs as the read-out parameter. This resulted in an estimated number of cats of 17 per experimental group. However, as a Latin Square design will be conducted, in which less variation is assumed, it was estimated that a total of 16 cats in the design (4 cats per group) is appropriate.

In vivo study 2: A Latin Square design will be used to minimise the number of cats. To determine sample-size, coefficient variations were calculated from the results of relevant studies in the literature<sup>3-7</sup>, and then compared with the coefficient variation of the reference<sup>2</sup> used for the sample size calculation for our second experiment in this proposal. A power analysis was performed with a power of 80%, an alpha of 0.05 and using serum AGEs as the read-out parameter. This resulted in an estimated number of cats of 17 per experimental group. However, as a Latin Square design will be conducted, in which less variation is assumed, it was estimated that a total of 16 cats in the design (4 cats per group) is appropriate.

<sup>1</sup>Sakai, M., Oimomi, M., & Kasuga, M. (2002). Experimental studies on the role of fructose in the development of diabetic complications. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, 48(5–6), 125–136.

<sup>2</sup>Mastrocola, R., Nigro, D., Chiazza, F., Medana, C., Dal Bello, F., Boccuzzi, G., ... Aragno, M. (2016). Fructose-derived advanced glycation end-products drive lipogenesis and skeletal muscle reprogramming via SREBP-1c dysregulation in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 91, 224–235.

<sup>3</sup>Birlouez-Aragon, I., Saavedra, G., Tessier, F. J., Galinier, A., Ait-Ameur, L., Lacoste, F., ... Lecerf, J. M. (2010). A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1220–1226.

<sup>4</sup>Brennan, C. M., Stenberg, M. G., Swan, M. S., Eversole, A., Maizels, N., Steitz, J. a, ... Barbara, a. (2003). Ian Reeve, David Hummel, Nathan Nelson, and John Voss, (17), 11441–11446.

<sup>5</sup>De Courten, B., De Courten, M. P. J., Soldatos, G., Dougherty, S. L., Straznicky, N., Schlaich, M., ... Forbes, J. M. (2016). Diet low in advanced glycation end products increases insulin sensitivity in healthy overweight individuals: A double-blind, randomized, crossover trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 103(6), 1426–1433.

<sup>6</sup>Li, M., Zeng, M., He, Z., Zheng, Z., Qin, F., Tao, G., ... Chen, J. (2015). Increased Accumulation of Protein-Bound N<sup>ε</sup>-(Carboxymethyl)lysine in Tissues of Healthy Rats after Chronic Oral N<sup>ε</sup>-(Carboxymethyl)lysine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(5), 1658–1663.

<sup>7</sup>Poulsen, M. W., Andersen, J. M., Hedegaard, R. V., Madsen, A. N., Krath, B. N., Monošík, R., ... Dragsted, L. O. (2016). Short-term effects of dietary advanced glycation end products in rats. *British Journal of Nutrition*, 115(4), 629–636. [## \*\*B. The animals\*\*](http://Semba, R. D., Gebauer, S. K., Baer, D. J., Sun, K., Turner, R., Silber, H. A., ... Novotny, J. A. (2014). Dietary Intake of Advanced Glycation End Products Did Not Affect Endothelial Function and Inflammation in Healthy Adults in a Randomized Controlled Trial. <i>Journal of Nutrition</i>, (7), 1037–1042.</a></p></div><div data-bbox=)

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

Healthy adult European short hair cats will be used for this project. All cats originate from a licensed breeder. Cats are being used because they are the target species of our hypothesis.

In vitro study: Total of 6 cats (20 ml of blood per cat) is estimated to be needed to collect the required blood volume (120 ml). It is chosen to slightly reduce the amount of blood drawn per cat as compared to the calculated maximum, to reduce the chance of adverse effects of larger amounts of blood drawl for the cats.

In vivo study 1: A total of 16 healthy adult European short hair cats will be used as the study subjects. These cats are specifically trained for standard nutrition research procedures, including standard blood collection techniques. The amount of cats needed is based on a Power analysis (see above).

In vivo study 2: A total of 16 healthy adult European short hair cats will be used as the study subjects. These cats are specifically trained for standard nutrition research procedures, including standard blood collection techniques. The amount of cats needed is based on a Power analysis (see above).

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

The cats that are going to be used for this experiment are part of a research cat colony. These cats are specifically trained for standard nutrition research procedures, including standard blood collection techniques, and will, after this experiment, continue to be used for other nutrition experiments and for students training purposes (e.g. learning cat handling techniques). The cats can be reused after recovery time of at least 14 days.

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

#### In vitro study:

- Reduction: Total required blood volume was calculated, then total number of cat is chosen to slightly reduce the amount of blood drawn per cat as compared to the calculated maximum, to reduce the chance of adverse effects of larger amounts of blood drawl for the cats (see A).
- Replacement: The blood collection is performed in cats, because the results are required to determine the necessary dosages for the follow-up study (in vivo study 1). Cats are being used because they are the target species of our hypothesis and there is no alternative species to replace cat.

#### In vivo study 1 and 2:

- Reduction: Latin Square design and appropriate sample size calculation will be used to minimise the number of cats needed.
- Replacement: Cats are being used because they are the target species of our hypothesis and there is no alternative species to replace cat. Alternative animals like rodents may likely differ from cats in digestion, absorption, and metabolism of AGEs, making extrapolation of findings in rodents to cats is not scientifically acceptable.

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

In order to prevent discomfort caused by blood sampling, a well-trained veterinarian or research technician will perform the blood sampling. Samples will be collected from the Jugular vein, and an anesthetic skin gel will be applied on the skin before sampling. These cats are specifically trained for standard nutrition research procedures, including standard blood collection techniques. This will also reduce the level of discomfort in the cats. Visual contact of the cats is possible during the 5-d confinement in the metabolic cages. To reduce social stress, during the 5-d confinement period, the cats will be placed back in the group for a minimum of 1 hour per day under supervision.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

Not applicable.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

housed according to the Directive in groups, except a 5 day period where the cats are housed individually in a metabolic cage to collect urine samples

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

An anaesthetic skin gel will be applied to the cat before blood sampling.

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

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

Five-day housing in metabolic cages.

Explain why these effects may emerge.

The confinement may result in stress.

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

Visual contact of the cats is possible during the 5-d confinement in the metabolic cages. In addition, during the 5-d confinement period, the cats will be placed back in group for a minimum of 1 hour per day under supervision to relief their social stress.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

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

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

Cats may possibly experience mild discomfort from blood sampling and restraint. As well as, they may have moderate discomfort from 5-d confinement.

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002017852

**Bijlagen**

2

Datum 1 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 januari 2017. Het gaat om uw project "Relevance of Advanced Glycation Endproducts in feline Nutrition". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002017852. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). 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

**Datum:**

1 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD108002017852

**Datum:**  
1 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD108002017852

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800  
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30275924  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
1 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD108002017852

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: PhD student  
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 maart 2017  
Geplande einddatum: 1 september 2020  
Titel project: Relevance of Advanced Glycation Endproducts in feline Nutrition  
Titel niet-technische samenvatting: Relevantie van eiwit-suiker verbindingen in kattenvoeding  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1035,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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



**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Utrecht  
Datum: 31 januari 2017

**Datum:**  
1 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD108002017852



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002017852  
**Bijlagen**  
2

Datum 1 februari 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 1 februari 2017  
Vervaldatum: 3 maart 2017  
Factuurnummer: 170852  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

| Omschrijving   | Bedrag |
|--|--------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD108002017852 | €      |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

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

1. Aanvraagnummer : 2016.I.809.018
2. Titel van het project : Relevance of Advanced Glycation End-products in feline nutrition
3. Titel van de NTS : Relevantie van eiwit-suikerverbindingen in kattenvoeding

#### 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: 13-12-2016
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 04-01-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 11-01-2017/16-01-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 30-01-2017

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

#### 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 11-01-2017
- Datum antwoord: 16-01-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

## Projectvoorstel

- 3.3 Belang: De DEC raadt u aan om bij *social relevance* nog aan te geven dat u n.a.v. de resultaten van het project de eigenaren van katten voedingsadvies kunt geven.  
*Dit is opgenomen in het projectvoorstel.*

## Bijlage 1

- F. Huisvesting en verzorging: De DEC raadt u aan om hier zowel "No" als "Yes" aan te vinken en een toelichting te geven: housed according to the Directive in groups, except a 5 day period where the cats are housed individually in a metabolic cage to collect urine samples.  
*Dit is toegevoegd aan de bijlage.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

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

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

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

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Niet alleen mensen worden steeds ouder, maar ook katten leven steeds langer. Een gevolg hiervan is dat katten steeds vaker chronische ouderdomsziekten krijgen, waaronder nierfalen en diabetes. Uit studies bij mensen is gebleken dat voeding een mogelijke risicofactor is in de ontwikkeling van chronische ouderdomsziekten. Tijdens het verhitten van voeding kunnen (afhankelijk van de samenstelling van de voeding en de verhittingsgraad en -duur) verbindingen worden gevormd tussen de suikers en de eiwitten, die "advanced glycation endproducts" (AGE's) worden genoemd. Deze verbindingen zijn normaal in het lichaam aanwezig, maar het vermoeden bestaat dat extra opname van deze AGE's belastend is voor het lichaam. Met betrekking tot de mens bestaat uitgebreide literatuur over AGE's, maar hoe deze AGE's het lichaam precies beïnvloeden is echter nog onduidelijk. Wel is bij de mens waargenomen dat bij sommige chronische ziekten, zoals hart- en vaatandoeningen en suikerziekte, de hoeveelheid van deze AGE's in het lichaam is toegenomen.

Uit onderzoek is gebleken dat ingeblikt kattenvoer, maar in nog sterkere mate droge kattenbrokken, met meer of minder plantaardige componenten waaronder suikers een hoog gehalte AGE's bevatten. Dit wordt mede veroorzaakt door de verhitting tijdens het productieproces. Steeds meer katteneigenaren geven dit type voer aan hun katten. Het is derhalve van belang uit te zoeken of van voedsel afkomstige AGE's van invloed zijn op de gezondheid van de kat en de pathogenese van chronische ouderdomsziekten bij de kat. Het project is opgedeeld in een drietal studies. Er zal worden gestart met een *in vitro/ex vivo* studie, waarbij in kattenbloed de invloed van exogene suikers op de vorming van endogene AGE's wordt bestudeerd. Vervolgens zullen er een tweetal *in vivo* studies plaatsvinden waarbij 1) het effect van dieetsuikers op de endogene vorming van AGE's en 2) het effect van dieet AGE's op de absorptie en uitscheiding van AGE's bestudeerd worden. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen is helder en vergelijkbaar met voorbeeld 4B uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project'.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is het verkrijgen van meer inzicht in de stofwisseling van eiwit-suikerverbindingen bij katten en de rol die voeding speelt bij de vorming van deze verbindingen. Het uiteindelijke doel van het project is achterhalen in hoeverre eiwit-suikerverbindingen bijdragen aan het ontstaan van ouderdomsziekten bij de kat. Met de gegevens die verkregen worden door het realiseren van het directe doel, kan vervolgonderzoek worden gedaan naar de effecten van eiwit-suikerverbindingen op het optreden van chronische ouderdomsziekten bij de kat. De resultaten van dat vervolgonderzoek kunnen mogelijk een antwoord geven op de vraag in hoeverre eiwit-suikerverbindingen bijdragen aan het ontstaan van ouderdomsziekten bij de kat en op basis daarvan kunnen katteneigenaren beter voorgelicht worden over welke voeding goed is voor hun kat. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doeldieren en de onderzoekers.  
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De katten zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en als gevolg van de bloedafname(s) zullen ze stress en pijn ondervinden. Daar tegenover staat dat de kat ook doeldier is en dat dit onderzoek de gezondheid van andere katten kan bevorderen. Dit onderzoek zal leiden tot meer inzicht in de voedingsfactoren die de gezondheid van de kat beïnvloeden en kan zodoende bijdragen aan het optimaliseren van de voeding voor de kat teneinde de gezondheid te bevorderen.

Voor de onderzoekers geldt dat dit project kan bijdragen aan een goede wetenschappelijke reputatie en kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten. Wetenschappelijke reputatie kan door de onderzoeker van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.

6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. Voor dit project is er samenwerking met een onderzoeksgroep die expertise heeft op het gebied van diervoeding. Deze onderzoeksgroep heeft ervaring met onderzoek van AGE's en voeding van gezelschapsdieren. Voor het meten van de AGE monsters is er samenwerking met een laboratorium gespecialiseerd in levensmiddelenchemie. De DEC is er daarom van overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Zoals bij C1 reeds vermeld, zal het onderzoek starten met een *in vitro/ex vivo* studie, waarbij in kattenbloed de invloed van exogene suikers op de vorming van endogene AGE's wordt bestudeerd. Vervolgens zullen er een tweetal *in vivo* studies plaatsvinden waarbij 1) het effect van dieetsuikers op de endogene vorming van AGE's en 2) het effect van dieet AGE's op de absorptie en uitscheiding van AGE's bestudeerd worden. Voor de *in vitro/ex vivo* studie zal bij een zestal katten 20 ml bloed worden afgenomen, waarna katten serum-albumine of rode bloedcellen worden geïncubeerd met verschillende types en concentraties van reducerende suikers (bijvoorbeeld glucose en fructose). Voor de *in vivo* studies zullen per studie 16 dieren gebruikt worden in een Latin Square design, bestaande uit 4 dieren en 4 verschillende diëten: drie test diëten en een controle dieet. Een dieetperiode (15-25 dgn) eindigt met het opvangen van urine. De dieren verblijven hiervoor 5 dagen solitair in een metabole kooi. Bij de dieren zal ook 5 keer bloed worden afgenomen: aan het begin van het experiment en na elke dieetperiode. Als uitleesparameter wordt de hoeveelheid serum AGE's gehanteerd. De DEC is derhalve van mening dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

### Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de dierproeven, voor de desbetreffende categorie, genoemde beperkende voorwaarden. De katten die gebruikt worden, zijn katten die op de instelling wonen en gebruikt worden voor diverse (voedings)experimenten of onderwijs met maximaal licht ongerief. Er zal een rustperiode van tenminste 14 dagen in acht worden genomen.

10. De dieren worden grotendeels gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn, met uitzondering van 4 keer een periode van 5 dagen waarin de dieren in een metabole kooi worden geplaatst om urinemonsters te kunnen nemen.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Als gevolg van een enkele de bloedafname is het ongerief voor zes dieren ingeschat als licht. Voor de overige voor de overige 32 dieren is het ongerief, als gevolg van 5x bloedafname en 4x individuele huisvesting in een metabole kooi, ingeschat als matig.
12. De integriteit van de dieren wordt in gedragsmatig opzicht aangetast. Door het solitair huisvesten in de metabole kooi wordt de dieren de mogelijkheid ontnomen om bepaalde aspecten van hun natuurlijk gedrag uit te oefenen (gedragsmatige aantasting).
13. Omdat er geen handelingen plaatsvinden die kunnen leiden tot een humaan eindpunt zijn er terecht geen humane eindpunten gedefinieerd.

### 3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De verwachting is dat de stofwisseling van eiwit-suikerverbindingen dermate complex is dat dit niet *in vitro* of *in silico* na te bootsen is. Om een volledig beeld te krijgen van de effecten van voeding op de stofwisseling van deze verbindingen zijn derhalve levende katten nodig.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Voor het berekenen en zo laag mogelijk houden van het aantal benodigde dieren worden statistische methoden en een Latin Square design toegepast. In de proefopzet is ervoor gekozen om vier voedingen te testen, waarbij iedere kat alle voedingen gevoerd krijgt. Op deze manier kan iedere kat ook zijn eigen controle zijn, wat het aantal benodigde katten reduceert.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Voor deze studie worden katten gebruikt omdat zij ook het doeldier zijn.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

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

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden niet gedood in het kader van het project.
20. Hergebruik is overwogen. De dieren gaan na afloop van het project weer terug naar het kattenverblijf van de instelling, omdat zonder meer aangenomen mag worden dat ze gezond blijven en geen blijvende schade lijden als gevolg van de experimenten.

*NTS*

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

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

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, gericht op het verkrijgen van meer inzicht in de stofwisseling van eiwit-suikerverbindingen bij katten en de rol die voeding speelt bij de beïnvloeding van deze stofwisseling, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met licht ongerief voor een deel van de katten en matig ongerief voor de katten die herhaaldelijk in metabole kooien worden gehuisvest. Daar staat tegenover dat dit onderzoek belangrijke nieuwe fundamentele informatie kan geven en deze nieuwe informatie op korte termijn van substantieel belang kan zijn voor het doen van vervolgonderzoek naar de effecten van eiwit-suikerverbindingen op het optreden van chronische ouderdomsziekten bij de kat. De resultaten van dat vervolgonderzoek kunnen mogelijk een antwoord geven op de vraag in hoeverre eiwit-



suikerverbindingen bijdragen aan het ontstaan van oudersomziekten bij de kat en op basis van die resultaten kunnen katteneigenaren beter voorgelicht worden over welke voeding goed is voor hun kat. De DEC kent daar veel gewicht aan toe.

Chronische oudersomziekten zoals diabetes en nierfalen, komen steeds vaker voor bij katten en kunnen leiden tot aanzienlijke, soms letale, gezondheidsklachten. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat katten betere, gezondere voeding krijgen. Katten die als huisdier worden gehouden zijn er dus bij gebaat dat met dit fundamentele project een basis gelegd wordt voor het verkrijgen van meer inzicht in de gezondheidseffecten van eiwit-suikerverbindingen in kattenvoeding.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. De dieren zullen wel ongerief ervaren, maar geen schade oplopen en kunnen na afloop zonder bezwaar weer teruggeplaatst worden in de kattenkolonie waar zij ook vandaan worden gehaald. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het verkrijgen van meer inzicht in de stofwisseling van eiwit-suikerverbindingen bij katten en de rol die voeding daarbij speelt een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[REDACTED]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD108002017852

**Bijlagen**

1

27 FEB 2017

Datum 24 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Relevance of Advanced Glycation Endproducts in feline Nutrition" met aanvraagnummer AVD108002017852. 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 "Relevance of Advanced Glycation Endproducts in feline Nutrition" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 1 september 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 30 januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Bezwaar**

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

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

**Datum:**

24 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD108002017852

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

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: Universiteit Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 1 september 2020, voor het project "Relevance of Advanced Glycation Endproducts in feline Nutrition" met aanvraagnummer AVD108002017852, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.  
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistent professor.  
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 januari 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 januari 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 30 januari 2017, ontvangen op 31 januari 2017.

| Naam proef  | Diersoort/ Stam   | Aantal dieren | Ernst                        | Opmerkingen |
|---|---|---------------|------------------------------|-------------|
| <b>3.4.4.1 Relevance of Advanced Glycation End-products in feline nutrition</b> |   |               |                              |             |
|   | Katten (Felis catus) / volwassen europese korthaar katten | 38            | 84%<br>Matig<br>16%<br>Licht |             |



**Aanvraagnummer:**

AVD108002017852

## 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

**Aanvraagnummer:**  
AVD108002017852

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.



| <b>Inventaris Wob-verzoek W17-07</b> |                                 |                        |             |               |              |                          |               |               |             |   |
|--------------------------------------|---------------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------|-------------|---|
|                                      |                                 | <b>wordt verstrekt</b> |             |               |              | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |             |   |
| <b>nr.</b>                           | <b>document NTS 2017853</b>     | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b> | <b>10.1.c</b>            | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |   |
| 1                                    | Aanvraagformulier               |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 2                                    | NTS                             | x                      |             |               |              |                          |               |               |             |   |
| 3                                    | Project proposal                |                        |             |               | x            | x                        | x             | x             |             |   |
| 4                                    | bijlage animal procedure 1      |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |   |
| 5                                    | bijlage animal procedure 2      |                        |             |               | x            | x                        | x             | x             |             |   |
| 6                                    | Ontvangstbevestiging            |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 7                                    | brief aanhouden ivm vragen CCD  |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 8                                    | mail DEC ivm aanvullende vragen |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 9                                    | brief reactie op vragen         |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 10                                   | DEC advies                      |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |
| 11                                   | Advies CCD aan bestuur          |                        | x           |               |              |                          |               |               |             | x |
| 12                                   | Beschikking                     |                        |             |               | x            |                          | x             |               |             |   |





06 FEB. 2017

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

|     |   |  |  |
|-----|---|--|--|
| 1.1 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in | 11400  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen           |  |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | Naam instelling of organisatie                                     | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam                           |
|     |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde                | [REDACTED]   |
|     |   | KvK-nummer   | 64156338   |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer   | de Boelelaan 1117  |
|     |   | Postbus  |  |
|     |   | Postcode en plaats   | 1081HV Amsterdam   |
|     |   | IBAN   | [REDACTED]   |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer                              | [REDACTED]   |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  | [REDACTED]   |
|     |   | Afdeling   | [REDACTED]   |
|     |   | Telefoonnummer   | [REDACTED]   |
|     |   | E-mailadres  | [REDACTED]   |
| 1.5 | <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  | Onderzoeker in opleiding   |
|     |   | Afdeling   | [REDACTED]   |
|     |   | Telefoonnummer   | [REDACTED]   |
|     |   | E-mailadres  | [REDACTED]   |

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |          |
|------------|----------|
| Startdatum | 1-4-2017 |
| Einddatum  | 1-4-2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe therapieën voor verbeterde wondgenezing
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |   |
|-------------|---|
| Naam DEC    | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| Postadres   | [REDACTED]                                  |
|             | Amsterdam   Nederland                       |
| E-mailadres | [REDACTED]                                  |

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287,-

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 1.3 opgegeven rekeningnummer.*

\* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.

Inkoopordernummer:

Factuuradres:

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

Amsterdam

1 - 2 - 2017



## Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).

### 1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- |                                |            |
|--------------------------------|------------|
| Naam van de portefeuillehouder | [REDACTED] |
| KvK-nummer                     | 64156338   |
| NVWA deelnemernummer           | 11400      |

### 2 Gegevens gemachtigde

- 2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN) Geef aan welk nummer u invult.
- |   |            |
|---|------------|
| <input type="checkbox"/> KvK-nummer     | [REDACTED] |
| <input checked="" type="checkbox"/> BSN | [REDACTED] |
- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?
- |                    |                      |   |
|--------------------|----------------------|---|
| Naam gemachtigde   | [REDACTED]           | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Adres of postbus   | [REDACTED]           |   |
| Postcode en Plaats | [REDACTED] Amsterdam |   |

### 3 Inhoud machtiging


- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?  Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.  
 Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken?  Ja > Ga door naar vraag 4  
 Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u 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

### 4 Ondertekening

- 4.1 Onderteken het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Naam gemachtigde 

Datum

1 6 - 0 8 - 2 0 1 6

Handtekening  
portefeuillehouder  
van de instelling

Handtekening  
gemachtigde





## Format Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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.

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

Dit projectvoorstel beoogt nieuwe therapieën te ontwikkelen voor de verbetering van wondgenezing van verschillende type wonden.

Er zijn twee subdoelen in dit project: 1. de bescherming van wonden tegen binnendringende bacteriën en 2. Het bevorderen van (de snelheid van) genezing.

Deze beide doelen gelden zowel voor acute wonden als voor chronische wonden.

Acute wonden zijn onder te verdelen in brandwonden en excisiewonden als model voor chirurgische wonden. Beide modellen zullen in dit onderzoek gebruikt worden omdat deze type wonden verschillen in de specifieke ontstekingsreactie en daardoor ook een specifiek genezingsproces hebben.

Bij deze wonden veroorzaken binnendringende bacteriën vaak complicaties. Door middel van nieuwe wondbedekkers willen we onderzoeken of we dit kunnen tegengaan zonder de kwaliteit van wondgenezing aan te tasten.

Voor chronische wonden gebruiken wij diabetische ulcers als model. Deze wonden genezen over het algemeen niet of heel traag. In dit deel van het project gaan wij middelen testen om de genezing te bevorderen, en vergelijken we diabetische wondgenezing met fibrotische en 'normale' wondgenezing.

| type wond         | dier   | wond type     | "voorbehandeling"  | kenmerk                   |
|-------------------|--------|---------------|--------------------|---------------------------|
| acute wonden      | varken | brandwonden   |                    | <u>excessieve</u> fibrose |
|                   | varken | excisiewonden |                    | "normale" genezing        |
|                   | muis   | excisiewonden | <u>Bleomycine</u>  | <u>excessieve</u> fibrose |
|                   | muis   | excisiewonden |                    | "normale" genezing        |
| chronische wonden | muis   | excisiewonden | diabetische muizen | vertraagde genezing       |

Uiteindelijk worden deze twee methoden gecombineerd en worden de beste middelen om genezing te bevorderen toegediend in combinatie met de beste nieuwe wondbedekker.

De verschillende wondtypen hebben specifieke kenmerken en daarom hebben de verschillende wondtypen ook een wond-specifieke behandeling nodig.

Met het ouder worden van de bevolking nemen de problemen met chronische wonden toe. Momenteel lijdt circa 1 – 2% van de wereldbevolking aan een of meer chronische wonden. Diabetes type 2 is hierbij een belangrijke co-morbiditeit.

Bij het genezingsproces spelen de ontstekingsreactie en de daarbij behorende groeifactoren een belangrijke rol. Chronische wonden laten een verstoorde ontstekingsreactie zien en een veranderd groeifactor profiel.

Wij gaan testen of we door specifieke groeifactoren die aanwezig zijn in bloedplaatjes toe te voegen de genezing kunnen bevorderen en tevens littekenvorming kunnen tegengaan.

Acute wonden zoals chirurgische wonden, bijvoorbeeld als gevolg van het uitsnijden van huid tumoren, genezen vaak met de vorming van littekens. Ook minder diepe wonden zoals donorsites voor huidtransplantaten kunnen een verstoorde genezing reactie laten zien bijvoorbeeld als gevolg van binnendringende bacteriën.

Een ander type acute wond is de brandwond. Dit kan een gedeeltelijk diepe wond zijn, een wond waarbij een deel van de lederhuid nog intact is of een volledig diepe wond waarbij de hele lederhuid is aangedaan. Brandwonden onderscheiden zich van andere acute wonden door een sterke ontstekingsreactie. Jaarlijks worden in Nederland circa 1500 mensen in een ziekenhuis opgenomen met brandwonden, daarvan overlijdt ieder jaar nog 4% aan hun verwondingen of bijkomende complicaties (Dokter 2014). Patiënten die wel overleven, kampen vaak met grote ontsierende littekens die functionele beperkingen met zich mee kunnen brengen. Zeker bij jonge kinderen, op dit moment relatief de meest vertegenwoordigde groep patiënten met brandwonden, leveren littekens problemen op tijdens de groei. Vaak is reconstructieve chirurgie nodig om de hinder die patiënten hiervan ondervinden te verminderen. Uit eerdere studies blijkt dat de tijd die nodig is voor het sluiten van de wond, de re-epithelialisatie, een belangrijke factor is die de uiteindelijke kwaliteit van het litteken bepaalt. Dit hangt o.a. samen met de diepte van de wond. Wonden die er langer over doen om te re-epithelialiseren, laten bijvoorbeeld meer contractie zien dan wonden die sneller genezen. Het ontwikkelen van nieuwe wonddressings en/of huidsubstituten blijft dan ook noodzakelijk om de wondgenezing verder te optimaliseren, om littekenvorming na brandwonden te verminderen.

In dit onderzoek zullen we alle typen acute wonden onderzoeken: excisie wonden (partiële en volledig diepe) en brandwonden (partiële en volledig diepe).

Om de effecten van de te onderzoeken producten op fibrose (littekenvorming) te onderzoeken gebruiken we ook een model waarin fibrose van de huid wordt opgewekt m.b.v. bleomycine.

De ontwikkeling van nieuwe wond-specifieke behandelingsmethoden die de wondgenezing kunnen bevorderen en gelijktijdig de toedieningsmethode verbeteren zal bijdragen aan de vermindering van een belangrijk maatschappelijk probleem. Daarmee kan potentieel een grote gezondheidswinst geboekt worden en dus kostenreductie bereikt worden in de gezondheidszorg. Dit project beoogt deze beide aspecten aan te pakken.

#### a) Plaatjes-rijk plasma producten

Plaatjes-rijk-plasma (PRP) wordt steeds vaker gebruikt bij de behandeling van acute en chronische wonden. PRP wordt verkregen uit bloed van de patiënt zelf doormiddel van centrifugatie. Hierdoor worden de bloedcellen gescheiden van de het plasma. Bloedplaatjes bevatten veel groeifactoren, die een belangrijke rol spelen bij de wondgenezing. Algemeen doel bij de behandeling met PRP is het stimuleren van (snelheid van) epithelialisatie, en soms wordt ook pijnbestrijding en/of antibacteriële werking beschreven. Door het gebruik van veel verschillende methoden om dit PRP te produceren is de samenstelling van het product erg variabel, bovendien kan de onderliggende ziekte of het trauma van de patiënt een effect hebben op de aantallen en de kwaliteit c.q. samenstelling van de inhoud (groeifactoren) van de bloedplaatjes (Ferreira 2006). Hierdoor kunnen de resultaten van de diverse studies moeilijk met elkaar vergeleken worden. Bovendien is er nog weinig inzicht in de optimale samenstelling van PRP voor de specifieke wondtypen.

Wij richten ons daarom op het ontwikkelen van een gestandaardiseerd PRP voor de verbetering van wondbehandeling. Wij gaan uit van allogene materiaal (materiaal niet van de patiënt afkomstig), zodat we een zo constant mogelijk product kunnen ontwikkelen om verschillende wondtypen te kunnen behandelen. Dit wordt lokaal, dus direct op de wond, toegediend in de vorm van een gel of crème. Allereerst hebben we de diverse in de literatuur gebruikte vormen van



PRP geanalyseerd m.b.t. de samenstelling van deze producten qua trombocyten, erythrocyten en leukocyten aantallen en de concentratie van verschillende componenten die betrokken zijn bij wondherstel, zoals groeifactoren, fibrinogeen en fibronectine. Momenteel worden deze producten getest in celkweken van fibroblasten en keratinocyten. Bij deze experimenten is gekeken naar proliferatie, migratie en differentiatie. Aanvullend worden in in vitro en ex vivo wondmodellen de wondgenezing bevorderende aspecten onderzocht.

De beste producten uit de in vitro testen zullen worden toegepast in verschillende diermodellen. Muizenmodellen zullen worden gebruikt om de effecten op de genezing te bepalen. Hiervoor gebruiken we diabetisch muizen als chronische wondmodel (Park et al., 2014) en met bleomycine behandelde muizen als acuut (fibrotisch) wondmodel (Usategui et al., 2014) en normale muizen (controle dieren). Vervolgens zal in het varkens model ook nog de toedieningsmethode worden onderzocht. In de verschillende diermodellen worden standaard brand- of excisie-wonden geïnduceerd, die met de geselecteerde PRP producten worden behandeld en geanalyseerd worden op wondgenezingsparameters. De PRP-producten zijn ontdaan van de immunogene componenten, dus verwachten wij geen afstotingsreactie in de muizen.

Het onderzoek zal daarmee resulteren in een optimale bereidings- en toedieningsmethode van allogeen PRP voor gebruik bij de behandeling van zowel acute (fibrotische) als chronische wonden. De resultaten zullen de basis vormen voor gerandomiseerde klinische trials om het gebruik van PRP van een 'black box' benadering naar een goed gedefinieerde, evidence-based, medische technologie voor wondbehandeling te brengen.

b) █████

Naast het bevorderen van de wondgenezing is het ook van belang dat infecties met microorganismen voorkomen worden. Het oppervlak en/of de locatie van wonden maken het soms lastig om het wondbed goed af te sluiten van de omgeving, en daarmee het binnendringen van bacteriën te voorkomen. Het aanbrengen en weer verwijderen van dressings en verbandmaterialen kan ervoor zorgen dat het wondgenezingsproces verstoord en daardoor vertraagd wordt. Bovendien is dit proces, dat veelal dagelijks herhaald moet worden, arbeidsintensief en pijnlijk.

Een recentelijk ontwikkeld prototype van een nieuw soort hydrogel, █████, biedt unieke eigenschappen als dressing voor acute en chronische wonden. De formulering van █████ is zo samengesteld dat deze een gelvorm aanneemt bij een temperatuur van meer dan 20°C. Dit maakt het mogelijk om █████ op de wond te sprayen, waarna zich vrijwel direct een hydrogel vormt. Hierdoor voegt de gel zich optimaal naar het wondbed, ook als de wond een onregelmatige vorm en diepte heeft. Hierdoor wordt voorkomen dat bacteriën het wondbed kunnen binnendringen. De gel zal het wondbed wel afschermen van de omgeving, maar blokkeert niet het uittreden van vocht zodat er geen oedeem vorming plaats vindt onder de gel. Onderzocht zal worden in welke mate en hoe lang █████ in staat blijft het binnendringen van bacteriën te voorkomen in een wondmodel in het varken. Voor dit onderzoek zullen uitsluitend acute wonden aangebracht worden. Idealiter zal door toepassing van █████ de frequentie van noodzakelijke verbandwissels teruggebracht kunnen worden.

c) Combinatie van PRP-product met █████

De optimale PRP formuleringen zullen gecombineerd worden met de optimale █████ formulering en het effect op de genezing van de wond zal hierbij bestudeerd worden. Hierbij zal onderzocht

worden welke dosis PRP-product het meest optimale effect op de genezing van de wonden heeft. De meest effectieve formulering zal vervolgens klinisch getest worden.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het hoofddoel van deze experimenten is nieuwe strategieën te ontwikkelen voor de genezing van complexe wonden door het stimuleren van het genezingsproces van chronische en acute (fibrotische) wonden en het vermijden van bacteriële complicaties. Hierbij wordt onderzocht welke componenten het product wel of juist niet moet bevatten en hoe het moet worden aangebracht. Een snelle sluiting van de wond kan leiden tot een betere kwaliteit van het litteken, daarnaast is er minder kans op infecties door bacteriën. Bacteriële infecties leiden tot vertraging of zelfs uitblijven van de wondgenezing, waardoor littekens of chronische wonden kunnen ontstaan. Het reduceren van de frequentie van verbandwissels is een secundair doel, dat potentieel een grote vermindering van pijn en gerelateerd trauma voor de betrokken patiëntenpopulatie tot gevolg heeft en bijdraagt aan reductie van werklust voor verplegend personeel.

De middelen die getest worden zijn een allogeen gestandaardiseerd PRP product en een nieuw type wond gel; ██████████

De volgende subdoelen zijn voor het project geformuleerd:

PRP

- Wat is de optimale samenstelling van een PRP product voor de verbetering van wondgenezing van acute, fibrotische of chronische wonden?
- Op welke manier kunnen PRP componenten het beste op de wond aangebracht worden?
- Welke behandel frequentie (bijvoorbeeld eenmalig of meerdere keren per week) is nodig om de wondgenezing te verbeteren?

██████████

- Is ██████████ in staat een acute wond (excisie- of brandwond) goed af te beschermen tegen bacteriële infecties
- Is ██████████ in staat de juiste wondomgeving te creëren.
- Hoe lang blijft ██████████ zijn barrière functie behouden.
- Is ██████████ effectief op een brandwond met brandwondkorst.
- Kan ██████████ gebruikt worden in combinatie met een huidtransplantaat.
- Kan ██████████ gebruikt worden als tijdelijk wondbedekker

Combinatie PRP en ██████████

- Kunnen PRP-componenten aangebracht worden in combinatie met ██████████ zodanig dat beide hun optimale werking behouden en welke dosering PRP is daarvoor nodig?

Haalbaarheid: Binnen de groep is ruime ervaring ██████████  
██████████  
██████████  
██████████  
██████████  
██████████  
██████████

██████████  
██████████  
██████████  
██████████  
██████████

PRP en ██████████ zullen reeds uitgebreid getest zijn op ex vivo huid en in organotypische kweek, zodat globale gegevens met betrekking tot effect op verschillende celtypen die betrokken zijn bij de wondgenezing bekend zijn ruim voor aanvang van de proeven. Omdat de wondomgeving in intacte organismen verschilt van het in vitro model (bv de ontstekingsreactie) dient er in proefdieren getest te worden voordat deze middelen in de mens toegepast kunnen worden. In het PRP project werken wij samen met een onderzoeksgroep die gespecialiseerd is in bloedproducten, deze onderzoeksgroep heeft eveneens expertise met het werken met muizen. In het ██████████ project wordt samengewerkt met de onderzoeksgroep die de gel ontwikkeld heeft. Binnen deze groep is eveneens expertise aanwezig met het testen van materialen voor wondgenezing in cavia's, muizen en ratten.

---

### 3.3 Belang

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

Momenteel zijn er geen goede behandelingen, die de wondgenezing van mensen met acute of chronische wonden versnelt. Het gebruik van de groeifactoren uit bloedplaatjes is veelbelovend. Bij succesvolle afronding, zal er verder getest worden in mensen door middel van een klinische en gerandomiseerde studie. Dit zou kunnen leiden tot een nieuwe evidence-based behandelstrategie voor mensen met acute en chronische wonden.

Het voordeel van het gebruik van een allogene plaatjes-rijk plasma product is dat hiermee de belasting om PRP te maken (i.e. bloedafname) verlegd wordt van de patiënt naar een donor, die dit vrijwillig afstaat. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat bij sommige onderliggende aandoeningen de bloedplaatjes niet optimaal zijn om PRP te maken. Daardoor kan bij een autoloog product niet makkelijk een gestandaardiseerd product gemaakt worden. De samenstelling van het bloed en de concentratie/kwaliteit/eigenschappen bloedplaatjes kan per patiënt sterk verschillen.

Bovendien maken de huidige behandel technieken veelvuldige verbandwissels noodzakelijk om het gevaar van bacteriële infecties te verlagen. Met name patiënten met brandwonden vinden deze dagelijkse verbandwissels zeer belastend en pijnlijk.

Eerder onderzoek, gedocumenteerd in verschillende publicaties, met deze diermodellen heeft aangetoond dat de resultaten goed te vertalen zijn naar de mens. In het verleden hebben wij en anderen aangetoond dat resultaten uit de varkensexperimenten goed te extrapoleren zijn naar de mens. In de studies in dit projectvoorstel wordt bij muizen voornamelijk naar de effectiviteit van

de behandelmethoden gekeken. In het varkensmodel worden de resultaten behaald in het muizenmodel geverifieerd en wordt er daarnaast ook gekeken naar de optimale wijze van toediening.

Door ontwikkeling en uiteindelijk toepassing van de innovatieve behandelingen die hier beschreven worden kunnen patiënten sneller genezen en kunnen de pijnlijke verbandwissels verminderd worden. Dit zal de kwaliteit van leven voor de patiënt verbeteren en kan kostenreductie in de zorg opleveren.

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

In de literatuur is uitgebreid beschreven dat diabetische muizen een vertraagde wondgenezing hebben en dat Bleomycine behandeling leidt tot fibrose (littekenvorming) bij wondgenezing in muizen. Wij zullen deze modellen gebruiken om resp. chronische en fibrotische wondgenezing te vergelijken met acute wondgenezing in muizen. We maken dus eerst chronische resp fibrotische excisiewonden, om vervolgens deze effecten te verminderen met behulp van PRP-producten. De verwachting is dat een specifieke samenstelling van PRP per wondtype noodzakelijk zal zijn. Voor het stimuleren van chronische wondgenezing verwachten wij dus een andere samenstelling PRP te ontwikkelen dan voor het tegengaan van littekenvorming. Dit testen wij met behulp van de verschillende wondmodellen in de muis. De wetenschappelijke vraag is dus of PRP producten de genezing van acute en chronische wonden kan verbeteren en littekenvorming kan tegengaan. In het varken zullen wij testen of bacteriële contaminatie van acute wonden (excisie- en brandwonden) voorkomen kan worden met een nieuw type verbandgel, ██████ Tenslotte worden beide nieuwe technieken gecombineerd getest op excisie en/of brandwonden in het varken om de vraag te beantwoorden of bacteriële contaminatie voorkomen kan worden en genezing bevorderd kan worden door deze technieken te combineren en zo tot een nieuwe behandeling van (brand)wonden te komen.

Om de doelstelling te bereiken is de volgende volgorde van experimenten gepland:

#### Onderzoek PRP

Voor dit onderzoek zullen verschillende muizenmodellen gebruikt worden:

- Commercieel verkrijgbare diabetische muizen voor onderzoek naar chronische wonden.
- Bleomycine behandelde muizen voor fibrose (littekenvormend) model. De dieren worden gedurende 4 weken dagelijks (m.u.v. weekenden) geïnjecteerd (subcutaan) met bleomycine.
- Wild type muizen voor normale wondgenezing.

Bij deze dieren zullen op de flanken, onder narcose, gestandaardiseerd wonden aangebracht worden met behulp van een biopteur (4-8 mm). De wonden worden behandeld met verschillende PRP preparaten of placebo. Gedurende de eerste week zal deze behandeling, onder narcose, maximaal 4 keer herhaald worden tijdens geplande verbandwissels.

(voor verdere details zie bijlage 1)

1. Karakteriseren chronisch en fibrotisch (litteken-vormend) wondmodel in muis.

(zie flow schema figuur 1, stap 1.1); (vergelijking in normale muizen, diabetische muizen en bleomycine-behandelde muizen: snelheid van wondgenezing wordt gemeten, in monsters van de wonden worden fibrose-parameters gemeten (Uitleesparameters: oa collageen, alpha-smooth muscle actine expressie/depositie, littekenvorming, de weefselmonsters worden geoogst na opoffering van de dieren)

2. Vervolgens wordt het effect van verschillende samenstellingen/bestanddelen van PRP op de genezing van verschillende wondtypen bestudeerd in normale muizen, diabetische muizen en bleomycine-behandelde muizen: (stap 1.2) (Uitleesparameters: oa collageen, alpha-smooth muscle actine expressie/depositie, littekenvorming)
3. Op basis van de verkregen resultaten worden de meest optimale PRP samenstellingen per wondtype gekozen die vervolgens worden getest in excisie- en brandwonden modellen in het varken om het effect op de genezing te bestuderen en een adequaat formulering/verbandstelsel te kunnen testen. (stap 1.3) (Uitleesparameters: oa collageen, alpha-smooth muscle actine expressie/depositie, littekenvorming, bij varkens kan ook een weefselmonster van ca 3 mm in doorsnee worden uitgenomen onder narcose, waarna het dier in de proef blijft) (zie bijlage 2)

#### Onderzoek ██████████

Simultaan aan de bovenbeschreven stappen zal in verschillende wondmodellen in het varken ██████████ als verbandmiddel worden getest.

4. ██████████ wordt in eerste instantie in partiele excisie wonden toegepast om de invloed op de genezingsreactie te onderzoeken (stap 2.1). Deze experimenten worden met en zonder toevoeging van bacteriën uitgevoerd om de barrière functie te onderzoeken.
5. Vervolgens zal ██████████ getest worden in brandwonden (partiele diepte) in varkens waarop een brandwondenkorst aanwezig is om de invloed hiervan op de werking van ██████████ te kunnen evalueren. (stap 2.2)
6. In volledig diepe wonden wordt de toepassing van ██████████ met een huidtransplantaat getest. (stap 2.3)

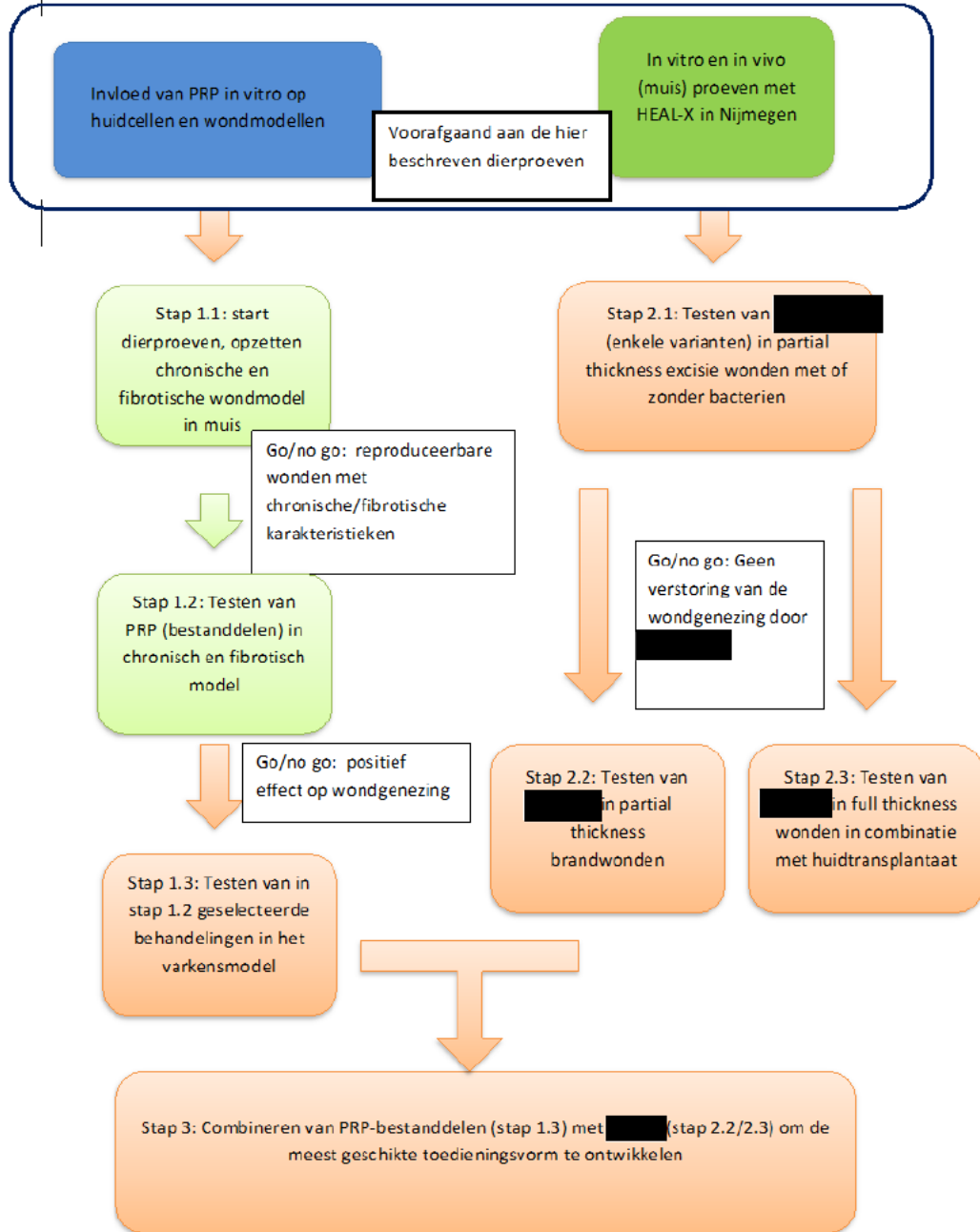
#### Combinatie PRP en ██████████

7. Op basis van de verkregen resultaten worden de meest optimale PRP (componenten) in combinatie met ██████████ en andere toedieningsmethoden getest in excisie- en brandwonden modellen in het varken om het effect op de genezing en een adequaat formulering/verbandstelsel te kunnen bestuderen. (stap 3)

Aan het einde van dit project willen we beschikken over voldoende bewijs voor veiligheid en effectiviteit om de stap naar humane toepassing te kunnen maken.

Innovatieve wondbehandelingen ter bevordering genezing van diverse typen wonden en het voorkomen van bacteriën in de wond

Blauw is in vitro, groen muis, oranje varken



Figuur 1: Flowdiagram.

We kiezen voor de muis vanwege de volgende argumenten:

- Er is een diabetische muis beschikbaar die het mogelijk maakt om ook chronische wonden te bestuderen.
- Met knaagdieren kunnen meerdere variabelen in relatief grote groepen getest worden.

- Veel eigenschappen van de muis zijn beschreven in literatuur.
- Formaat van het dier en de wond is respectievelijk klein en groot genoeg om te behandelen

Voor de vervolggexperimenten kiezen we voor het varken vanwege de volgende argumenten:

- De huid van het varken komt meer overeen met de huid van de mens.
- Het genezingsproces in het varken is vergelijkbaar met genezing bij de mens.
- De behandeling van varkenswonden sluit meer aan bij de klinische praktijk dan de behandeling van knaagdieren.
- Op het varken is het mogelijk verbandtechnieken te gebruiken die direct te vertalen zijn naar gebruik bij de mens
- Er zijn meerdere behandelingen per dier mogelijk

#### Onderzoek plaatjesrijk plasma:

Ad 1: (Stap 1.1 in flowdiagram) Allereerst zullen in de muis de modellen voor de verschillende soorten wonden worden opgezet en gekarakteriseerd aan verschillende wondgenezing parameters (snelheid van wondgenezing wordt gemeten, in monsters van de wonden worden fibrose-parameters gemeten (bijv collageen, alpha-smooth muscle actine). Vervolgens zullen deze modellen gebruikt worden om de verschillende samenstellingen van PRP te bestuderen op de genezing van deze wonden.

Chronische/acute wonden: voor chronische wondgenezing worden diabetische muizen aangeschaft. Hun behandeling is verder identiek aan die van de controle muizen: er worden wondjes gemaakt zoals beschreven in de bijlage, snelheid van genezing wordt gemeten met behulp van planimetrie op basis van foto's. Op verschillende tijdstippen wordt verband geïnspecteerd (dagelijks) en zo nodig gewisseld, eerste week dagelijks vervolgens 2 maal per week. Foto's worden tijdens de verbandwissels genomen (dier onder verdoving). Voor het oogsten van wondweefsel worden op verschillende tijdstippen (ongeveer dag 4, 7, 14, 21 en 28) dieren geëuthanaseerd.

Voor het bestuderen van fibrotische wondgenezing worden de dieren voor aanvang van de proef gedurende ca 4 weken blootgesteld aan (subcutane injectie) toediening van bleomycine zoals beschreven in de literatuur. De procedure van bestuderen van genezing is identiek aan die hierboven beschreven voor de chronische/acute wonden, met als toevoeging dat in deze wonden specifiek naar fibrotische markers (TGF beta, alpha-smooth muscle actine) gekeken zal worden in het geogste wondweefsel (na euthanasie).

#### Ad 2 (Stap 1.2 in flowdiagram) Plaatjesrijk plasma

Momenteel worden de verschillende componenten van PRP in celweek op huidcellen en in in vitro/ex vivo wondmodellen getest. Werkzame componenten zullen vervolgens in vivo getest worden in een excisie wondmodel in {diabetische} muizen voor chronisch wonden, gewone muizen voor acute wonden en bleomycine behandelde muizen als fibrotisch **acuut** wondmodel. De beste formuleringen zullen vervolgens getest worden in varkens om de juiste toedieningsvorm in combinatie met verbandtechniek te kunnen onderzoeken.

Op de rug/flank van diabetische muizen zullen excisie wonden gemaakt worden, die met

verschillende PRP varianten behandeld zullen worden. Vervolgens wordt de wondgenezing gevolgd en vergeleken met die in normale muizen en muizen die vooraf behandeld zijn met middelen zoals bleomycine om een fibrotisch wondmodel te creëren. Tijd tot wondgenezing wordt gevolgd, maar ook wordt de ontstekingsreactie bestudeerd en wordt de kwaliteit van het wondweefsel gemeten met behulp van (immuun)histochemische parameters en/of RNA analyse. Ad 3 (Stap 1.3 in flowdiagram) Tenslotte worden de meest veelbelovende PRP varianten getest in het wondmodel in het varken. Hier wordt vervolgens de tijd tot genezing (re-epithelialisatie) en de kwaliteit van de genezing gemeten met (immuun)histochemische parameters en/of RNA.

### Onderzoek [REDACTED]

Stimuleren van wondgenezing en voorkomen van bacteriële contaminatie [REDACTED] is een nieuw type wondgel, die zowel als hydrogel als in de vorm van een spray op de wond aangebracht kan worden. Door de unieke temperatureigenschappen (vloeibaar bij lage temperatuur (tussen 8-20°C) en gelvorm bij temperaturen vanaf 25 °C) is deze hydrogel bijzonder geschikt als wondverband. In eerste instantie wordt door middel van in vitro proeven vastgesteld of deze gel de viabiliteit en proliferatie van huidcellen beïnvloedt, en zo ja, in welke mate. Vervolgens wordt vastgesteld dat geen belangrijke inflammatoire reacties optreden bij toepassing van de componenten van de hydrogel bij muizen [REDACTED]: Deze experimenten maken geen deel uit van deze projectaanvraag). Nadat voldoende duidelijkheid is verkregen met betrekking tot de stabiliteit van de gel, wijze van aanbrengen, cytotoxiciteit en biocompatibiliteit (het optreden van nadelige effecten op de cellen in de wond en huid en eventuele afstotingsreacties), is het noodzakelijk de gel in het varkensmodel te testen. Bij deze dieren zijn meerdere behandelingen per dier mogelijk. Er worden achtereenvolgens verschillende wondmodellen in het varken toegepast: partiële of volledige diepte, excisie of brandwonden en huidtransplantatie. De keuze van het toe te passen wondmodel hangt samen met de verschillende indicatiegebieden voor de verschillende varianten van [REDACTED]. Deze wondmodellen geven een betere voorspelling voor het uiteindelijke gedrag van de wondgel en de bij de wondgenezing betrokken cellen in de mens dan de wondmodellen in andere dieren. Ook worden identieke verbandsystemen als bij de mens toegepast bij het varken; dit is in de cavia of muis technisch niet mogelijk. Achtereenvolgens zullen verschillende versies van [REDACTED] getest worden:

Ad 4: (Stappen 2.1 flowdiagram) als wond dressing in wondmodellen voor schaafwonden (model donorsites (de plaats waar de te transplanteren huid wordt afgeschaafd voor huidtransplantaties),

Ad 5: (Stappen 2.2 in flowdiagram) wonden van gedeeltelijke diepte (zoals bv heetwaterverbrandingen) en

Ad 6: (Stappen 2.3 in flowdiagram) volledige diepte (bv diepe brandwonden en chronische wonden na debridement (het verwijderen van dood weefsel uit de wond)). Bij deze wonden worden huidtransplantaten toegepast en speelt het voorkomen van bacteriële contaminatie een belangrijke rol.

Ad 7: (Stappen 3 in flowdiagram) Tenslotte zal [REDACTED] in combinatie met PRP-componenten in het varkensmodel toegepast worden.

---

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

### Onderzoek plaatjesrijk plasma:



### Stap 1.1 flowdiagram Muizen, type dierproef 1

Opzetten verschillende wondmodellen in muizen.

De in de literatuur beschreven modellen zullen in deze eerste stap worden opgezet.

In db/db muizen (diabetisch model) en muizen behandeld met bleomycine (fibrotisch model) worden onder narcose excisie wonden aangebracht van circa 8 mm in diameter (maximaal 4 per dier, minimaal 4 mm uit elkaar). Op verschillende tijdstippen, tussen 1 en 14 dagen na inductie van de wonden, worden de dieren gedood en worden de wondgebieden uitgesneden. De wondgenezing wordt beoordeeld op chronische dan wel fibrotische karakteristieken.

Uitkomstparameters worden gemeten d.m.v. macroscopische (wondmorfologie: diameter/wondsluiting) en microscopische ((immuno-)histochemische) technieken. De parameters zullen zijn: fibrose (myofibroblasten), contractie, epitheel (uitgroei), granulatieweefsel, bloedvatontwikkeling en ontsteking.

### Stap 1.2 flowdiagram Muizen

De werkzaamheid van plaatjesrijk plasma voor het stimuleren van genezing van chronische wonden zal getest worden in *db/db muizen*, die Diabetes type 2 ontwikkelen (Park 2014). Bekend is dat deze conditie leidt tot verstoorde wondgenezing. Dit zal vergeleken worden met identieke experimenten in *controle muizen (wild type)*, aangevuld met testen in muizen waarin een *fibrotisch fenotype* (Usategui 2014) is opgewekt. Excisie van wonden tot circa 8 mm in diameter (maximaal 4 per dier, minimaal 4 mm uit elkaar) zal plaats vinden onder narcose, waarna de wonden behandeld worden met verschillende PRP producten of placebo. Op verschillende tijdstippen, tussen 1 en 14 dagen na inductie van de wonden, wordt een deel van de dieren gedood en worden de wondgebieden uitgesneden. Uitkomstparameters worden gemeten d.m.v. macroscopische (wondmorfologie: diameter/wondsluiting) en microscopisch ((immuno-)histochemische technieken). De parameters zullen zijn: fibrose, contractie, epitheel en bloedvatontwikkeling en ontsteking.

### Stap 1.3 flowdiagram Varkens, type dierproef 2 (deel)

Na selectie van de best werkzame samenstelling en/of componenten van de PRP producten/bestanddelen in het muismodel zullen aanvullende proeven gedaan worden in het wondmodel in het varken. De wondgenezing in het varken is beter vergelijkbaar met die in de mens, door structuur en opbouw van de huid. Hiervoor zullen zowel wonden van partiële diepte als volledige diepte (met transplantatie) gebruikt worden. Deze wonden worden aangebracht door met een dermatoom (electrisch mes dat op breedte en diepte instelbaar is) huid af te schaven. Per dier zullen maximaal 14 excisiewonden worden aangebracht van 3x3 cm of maximaal 10 brandwonden van 4x4 cm, de grootte en aantal van de wonden is gebaseerd op eerder onderzoek met deze proefdieren. De individuele dieren zullen of excisiewonden of brandwonden krijgen. Behalve partiele en volledig diepte excisiewonden zullen ook brandwonden van partiele diepte behandeld worden om het effect op de verhoogde ontstekingsreactie beter te kunnen volgen. De brandwonden worden aangebracht met behulp van een verhit koperen blok van 4x4 cm. Maximaal zullen 10 brandwonden per dier worden aangebracht. Per dier kunnen verschillende behandelingen getest worden, waardoor een betere onderlinge vergelijking van de werkzaamheid van de verschillende componenten mogelijk wordt. Naast effecten van de behandeling op de genezing zal in het varken ook de meest optimale toedieningsvorm en verbandtechniek onderzocht worden. (Zie ook volgende onderdeel.)

## Onderzoek [REDACTED]

De [REDACTED] wonddressings worden eerder getest in in vitro proeven en in muizen ([REDACTED]). Echter, in deze dieren is het niet mogelijk een volledig wond dressing systeem te ontwikkelen dat bij de mens gebruikt kan worden, aangezien knaagdieren dat niet/slecht toelaten. Ook huidtransplantaties, een belangrijk indicatiegebied voor het gebruik van [REDACTED] dressings, zijn bij knaagdieren matig uitvoerbaar. In het varken kan dit wel getest worden en er is ruime ervaring met het aanbrengen van dergelijk wond dressing systemen uit eerdere studies.

### Stap 2.1 Flowdiagram, type dierproef 2 (resterend deel)

Allereerst zal [REDACTED] getest worden in een wondmodel in het varken dat overeenkomt met wonden van gedeeltelijke diepte, zoals de donorsites voor huidtransplantaten of schaafwonden. Deze wonden worden aangebracht door met een dermatoom (electrisch mes dat op breedte en diepte instelbaar is) huid af te schaven (3 x 3 cm). In deze wonden kan goed getest worden welk secundair verband het meest geschikt is om over de hydrogel aan te brengen. Tevens wordt in dit model gekeken naar de genezingscondities (wordt bv een vochtig wondmilieu gecreëerd door [REDACTED]) en wordt genezingsstijd gemeten. Na succesvol doorlopen van deze tests zullen voorbereidingen beginnen voor het klinisch testen van [REDACTED] bij dit type wonden.

### Stap 2.2 Flowdiagram Vervolgens zal in het varkensmodel voor partiële diepte brandwonden bestudeerd worden of en op welke wijze [REDACTED] in staat is te functioneren als membraanverband.

De behandeling met [REDACTED] zal vergeleken worden met de gouden standaard voor dit type brandwondbehandeling, nl hydrofiber verband (Aquacel) of donorhuid (geglyceroliseerde cadaverhuid [REDACTED]). Deze wonden zullen worden aangebracht als contactverbranding met een verhit koperen blok (4 x 4 cm). Een belangrijk verschil met de gedeeltelijk-diepe excisiewonden is dat in deze wonden sprake is van necrotisch weefsel. Daardoor zullen we kunnen bestuderen of [REDACTED] ook in deze omstandigheden in staat is de wond goed af te blijven sluiten voor bacteriële contaminatie. Eventueel kan provocatie met bacteriën plaats vinden.

Stap 2.3 Flowdiagram Tenslotte zal [REDACTED] getest worden in het varkensmodel als wond dressing over excisiewonden van volledige diepte, die vervolgens behandeld zijn met een huidtransplantaat. Excisie vindt plaats met behulp van het dermatoom, zo nodig aangevuld met excisie met het mes tot volledige diepte van de huid. Deze wonden zijn tot 3 x 3 cm in oppervlak. Hierbij zullen we kunnen beoordelen of [REDACTED] ook onder deze moeilijker omstandigheden (meer wond exsudaat bijv.) stabiel blijft, en hoe lang de integriteit van het wondverband en daarmee het beschermende milieu gehandhaafd blijft en wat het effect op het huidtransplantaat is (bv graft take en uitgroei).

Stap 3 Flowdiagram: De geselecteerde PRP-producten (stap 1.3) zullen gecombineerd worden met de geselecteerde [REDACTED] preparaten (stap 2.2/2.3) om de meest geschikte toedieningsvorm te ontwikkelen.

---

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.

Zie tevens figuur 1. Flowdiagram

Om effecten van verschillende samenstellingen van PRP dan wel de componenten van PRP (PRP formuleringen) op de genezing van verschillende wondtypen te kunnen bestuderen worden er verschillende muismodellen opgezet.

Keuzemoment: Indien de wonden niet reproduceerbaar zijn of niet aan de karakteristieken voor de verschillende wondtypen voldoen volgt er uiteraard een beslismoment. Aangezien deze verschillende modellen uitgebreid in de literatuur beschreven zijn en onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft m.b.t. in vivo wondmodellen verwachten we hier niet veel problemen.

Mijlpaal: Reproduceerbare wondmodellen voor verschillende wondtypen

Vervolgens zullen in de verschillende modellen verschillende PRP formuleringen getest worden om de optimale formulering per wondtype te bepalen.

Keuzemoment: Indien geen enkele formulering een gunstig effect heeft op de genezing van een wondtype zal het onderzoek voor dat wondtype gestaakt worden.

Mijlpaal: Per wondtype de meest optimale PRP formulering ter bevordering van het genezingsproces

██████ zal in het varken partiele diepte excisie model getest worden op functionaliteit als wondbedekker.

Keuzemoment: Indien ██████ de genezing nadelig zou beïnvloeden wordt de gel op dat aspect aangepast

Mijlpaal: Een nieuw type wondbedekker dat de vochtbalans in de wond goed reguleert en de wond beschermt tegen micro-organismen.

Het effect van ██████ als wondbedekker of tijdelijk transplantaat op brandwond en

A) een partieel diepe brandwond met een necrotische korst.

B) een volledig diepe wond die behandeld wordt met een huidtransplantaat, eventueel als tijdelijk transplantaat.

Keuzemoment: Indien zou blijken dat ██████ kan de brandwond niet kan afsluiten, de genezing van de brandwond cq de overleving van het transplantaat verstoord worden, wordt de gel op deze aspecten aangepast voordat de volgende fase van ontwikkeling gestart wordt.

Mijlpaal: een goed afsluitende wondbedekker die een aantal dagen zijn werking doet en eventueel als tijdelijk transplantaat kan dienen en het definitieve huidtransplantaat niet negatief beïnvloed.

Ontwikkelen van juiste toedieningsvorm en verbandmethode voor het aanbrengen van PRP formuleringen en ██████

Mijlpalen: Vaststellen van de meest optimale toedieningsvorm en verbandmethode voor het aanbrengen PRP formuleringen en ██████ op wonden.

| Onderdeel | Jaar 1   | Jaar 2   | Jaar 3                            | Jaar 4                            | Jaar 5                            |
|-----------|----------|----------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| a) PRP    | Genezing | Genezing | Genezing wonden en transplantaten |                                   | Genezing wonden en transplantaten |
| b) ██████ |          |          | Genezing wonden en transplantaten | Genezing wonden en transplantaten | Genezing wonden en transplantaten |

Muis (1.1 en 1.2) Type dierproef 1

Varken(1.3, 2.1, 2.2, 2.3 en 3) Type dierproef 2

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

| Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 1          | 1. Behandeling van chronische en acute wonden en fibrotisch acute in muizen met plaatjes-rijk-plasma (PRP) producten                |
| 2          | 2. Behandeling van wonden in varkens met PRP producten en/of <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> |
| 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 11400
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Vrije Universiteit Medisch Centrum Amsterdam
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Behandeling van chronische en acute wonden en fibrose in muizen met plaatjes-rijk-plasma (PRP) producten |
- 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.

Plaatjes-rijk-plasma (PRP) wordt steeds vaker gebruikt bij de behandeling van acute en chronische wonden. PRP wordt verkregen uit bloed door middel van centrifugatie. Hierbij worden de bloedcellen, hoofdzakelijk bloedplaatjes, gescheiden van het bloedplasma. Door verschil in de gebruikte technieken ontstaan verschillen in de samenstelling (formulering) van het eindproduct, bv doordat bepaalde celtypen (o.a. witte bloedcellen) wel of juist niet verwijderd worden. Ook kan dit product per patiënt verschillen bv omdat de onderliggende aandoening van de patiënt een effect heeft op de samenstelling of activiteit van de bloedplaatjes. Daardoor verschilt de effectiviteit van deze producten vaak. Daarom willen we een, qua samenstelling, gestandaardiseerd product ontwikkelen. Om het effect van verschillende PRP formuleringen op de genezing van verschillende wondtypen te kunnen bestuderen kiezen we voor de muis als diermodel. Er zijn diabetische muizen commercieel verkrijgbaar waarin een genezing van chronische wonden bestudeerd kan worden. Door het wild type van deze muizenstam te gebruiken kunnen we de effecten van verschillende PRP formuleringen ook in een "normaal" genezingsmodel bestuderen. Tot slot kunnen we in het zelfde wild type muis een fibrotisch model induceren door bleomycine toe te dienen. Bleomycine is een chemische stof die in verschillende organen fibrose kan opwekken, het wordt in de literatuur vaak gebruikt om fibrotische processen te kunnen bestuderen. Bovendien kunnen in deze muizenmodellen relatief veel verschillende formuleringen getest worden. In het eerste experiment worden de 3 verschillende wondmodellen gekarakteriseerd. In dit experiment zullen de specifieke wond karakteristieken van de wondtypen bestudeerd worden, zoals de duur van de genezing, re-epithelialisatie en fibrose. Dit wordt gedaan door de wond macroscopisch te beoordelen of met behulp van

microscopische technieken waarbij het weefsel voor specifieke fibrotische kenmerken aangekleurd kan worden (immunohistochemie).

Vervolgens zullen verschillende formuleringen van PRP getest worden in de afzonderlijke wondmodellen. Primaire uitkomstmaten zijn de snelheid van re-epithelialisatie en tijd tot wondsluiting. Door het nemen van weefselmonsters (biopten) zullen ook de angiogenese (ingroei van nieuwe bloedvaten) (CD31) epitheel vorming (pan-keratine, VEGF) en fibrose (alpha Smooth Muscle Actine) bestudeerd 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.

Om fibrose te induceren bij de wild type (WT) muis, wordt 4 weken voorafgaand aan de proef (dag -28) gestart met het dagelijks (m.u.v. weekend) intradermaal injecteren van bleomycine op de rug van WT muis, deze fibrose muis zal worden aangeduid als WTfibrose muis (WTfibr). Op dag 0 wordt bij alle groepen muizen (diabetische db/db, fibrose wild type (WTfibr) en de controle groep wild type (WT) één of enkele wonden gemaakt met een biopteur (doorsnede van 4-8 mm), dit wordt mede gebaseerd op beschrijvingen uit de literatuur. Perioperatief wordt adequate pijnstilling toegediend en het maken van de wonden gebeurt onder adequate anesthesie. De grootte van de wonden wordt gefotografeerd en vervolgens worden de wonden verbonden. Op dag 1 worden, onder passende anesthesie, de wonden behandeld met een PRP formulering, de verbanden zo nodig verschoond en de wond wordt geëvalueerd. Deze behandeling met PRP formulering zal maximaal 4x herhaald worden tot maximaal dag 7. Daarna worden de wonden op verschillende tijdstippen geëvalueerd tot maximaal dag 28 (2X/week). Tevens zullen er op vooraf bepaalde vaste tijdstippen een aantal dieren worden geofferd door middel van CO2 inhalatie, om vervolgens de wonden uit te snijden voor histologie. Afhankelijk van de vraagstelling zullen op verschillende tijdstippen dieren geofferd worden: tijdstip ca. dag 4 en 7 voor wondgenezing; ca. dag 14 en 28 voor evaluatie littekenvorming.

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

Het aantal varianten van PRP dat getest gaat worden (en daarmee het aantal benodigde dieren), wordt beperkt door in vitro screening vooraf. Voor aanvang van de dierexperimenten zullen diverse aspecten van PRP producten getest zijn in in vitro celkweek en ex vivo huid proeven. Er wordt getest op effecten op migratie en proliferatie van fibroblasten en keratinocyten in celkweek en in het ex vivo brandwondmodel. Tevens wordt van de PRP varianten de groeifactorconcentratie, cytokinen samenstelling en concentratie en plaatjesfuncties bepaald. Tevens worden dezelfde effecten van opgezuiverde relevante groeifactoren (zoals PDGF) in in vitro experimenten bepaald. Hierdoor is het mogelijk voor aanvang van de dierexperimenten de varianten van PRP te selecteren die de beste eigenschappen hebben om in vivo wondgenezing te stimuleren.

## **B. De dieren**

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

Soort: Muis; De dieren worden bij een erkende leverancier aangeschaft (Diabetische muizen (db/db): BKS(D)-Leprdb/JOrIRj en wild type muizen C57BLKS/J)

Als model voor chronische wondgenezing is eigenlijk alleen de db/db muis goed gedefinieerd. Daarom is gekozen voor deze diersoort, aangezien de uiteindelijke toepassing bedoeld is voor zowel acute als voor chronische wonden. Om goed de vergelijking te kunnen maken tussen chronische, fibrotische en acute wondgenezing zullen we de db/db mutant en wild type muizen gebruiken. Wild type muizen zullen behandeld worden met bleomycine om de fibrotische wondgenezing te bestuderen en de niet bleomycine behandelde wild type muizen dienen als controle voor acute wonden.

Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren van ongeveer dezelfde leeftijd zullen gebruikt worden.

Een voorlopige berekening is te maken met effect op wondgenezing als uitkomstmaat: een (minimaal) verschil in wondgenezing van 10% met een veronderstelde SD van 8 à 9 geeft een effect size van 1.1 tot 1.25 en een  $n=10$  à  $n=12$  bij een power van 0.8 en  $\alpha=0.05$  (Gpower versie 3.1.9.2). Indien we rekening houden met uitval van  $< 10\%$  is een maximale groepsgrootte van  $n=12$  nodig.

Totaal: 648 muizen maximaal.

Er zal een pilot gedaan worden om te testen hoeveel wondjes per dier behandeld kunnen worden en hoe groot deze dienen te zijn. Dit zal met diabetische, fibrotische en controle muizen gedaan worden. Ook zal getest worden hoe lang deze wondjes erover doen om te genezen zodat de tijdpunten van verzamelen van wondmateriaal vervolgens goed gekozen kunnen worden. Hiervoor zijn maximaal 3 keer 12 muizen nodig =36 muizen, waarvan 12 db/db muizen.

Er wordt rekening gehouden met het testen van in totaal max 14 verschillende PRP formuleringen.

Er worden echter verschillende producten getest voor acute dan wel chronische wondgenezing. Daarom is het aantal controle dieren hoger, aangezien die in beide proefopzetten van belang zijn.

Muizen (WT): maximaal 15 behandelingen (inclusief controle groep) x 12 dieren/groep x 2 tijdpunten = 360 muizen +24 voor de pilot = 384

Bleomycine behandelde muis: maximaal 7 behandelingen (inclusief controle groep) x 12 dieren/groep x 1 tijdstip (14 dagen, eindpunt fibrose) = 84

Db/db muizen: maximaal 7 behandelingen (inclusief controle groep) x 12 dieren/groep x 2 tijdpunten = 168 +12 voor de pilot = 180

Bron: erkende leverancier

Leeftijd/gewicht: Diabetische muizen zijn gemiddeld ca 16 weken oud. De leeftijd van controle en fibrotische muizen zal overeenkomstig gekozen worden.

### **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

Tijdens de in vitro testen wordt al bepaald welke producten getest zullen worden in een diermodel.

Wondgenezing is echter een complex proces, zeker bij chronische wonden, dat niet geheel in alle facetten in vitro onderzocht kan worden. Zo zijn er bijvoorbeeld geen ontstekingscellen aanwezig. Daarom moet de werking van deze producten in een diermodel onderzocht worden.

Vermindering

Door meerdere wonden op één dier aan te brengen kan het aantal dieren teruggebracht worden. Dit zal in een eerste proefopzet getest worden, bij het opzetten van het model. Daaruit moet duidelijk worden of er meerdere kleinere wonden per dier aangebracht kunnen worden (maximaal 2 per dier) zodat de experimenten met minder dieren uitgevoerd kunnen worden. Hierbij wordt gekeken naar de volgende aspecten: kunnen de wonden fysiek van elkaar onderscheiden worden tbv behandeling en evaluatie (er moet enige afstand tussen de wondjes zijn om te voorkomen dat de ene behandeling in de andere doorloopt); is er geen systemische component aanwezig in de te testen behandeling; en wordt het wondoppervlak per dier niet te groot. Hierbij baseren we ons (mede) op literatuur en ervaring.

### Verfijning

Er wordt gebruikt gemaakt van humane eindpunten, adequate pijn stilling, anesthesie door getraind personeel. Hierdoor zal uitval van dieren zoveel mogelijk worden voorkomen.

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.

Vooraf en na afloop van de handelingen wordt adequate pijnstilling (zie onder H) toegediend, alle handelingen die pijn kunnen veroorzaken vinden plaats onder algehele narcose. Om er zeker van te zijn dat het verband intact blijft, is het noodzakelijk om alle dieren solitair te huisvesten vanaf de eerste ingreep tot het einde van de proef. Dieren kunnen anders bij elkaar het verband of de wond(-korst) stukmaken.

## 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.

PRP producten zijn in de literatuur beschreven. De producten zijn echter zeer variabel en niet gekarakteriseerd. Wij zullen juist gekarakteriseerde en goed gedefinieerde producten gaan testen. Deze zijn in de literatuur niet beschreven en zullen een belangrijke bijdrage leveren voor verbetering van wondgenezing van complexe wonden in de praktijk.

## 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.

De dieren worden solitair gehuisvest. Dit is noodzakelijk omdat de dieren anders aan elkaars wonden en verbanden zouden kunnen knagen.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.



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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voorafgaand aan de ingreep wordt een passende pijnstilling toegediend, deze wordt na 8 uur en indien nodig herhaald. Op basis van eerder opgedane ervaring en literatuur is dit de meest optimale methode.

Inschatting van pijn bij muizen:

-Gewicht: de dieren worden dagelijks gewogen in de eerste periode (week 1) na de ingreep. Als dieren afvallen, of op gewicht blijven (terwijl ze volgens de algemene groeicurve horen te groeien) dan kan dat een teken zijn dat ze zich niet goed voelen.

-Vacht en verzorging: het niet/slecht verzorgen van de vacht, vieze oogjes/neus, omhoog staan van de vacht zijn allemaal tekenen dat ze zich niet goed voelen.

-Gedrag: ze horen actief en nieuwsgierig te zijn. Als ze zich niet goed voelen kan dat zich uiten in bijv: sloomheid, weinig reactie op aanraking, of juist extreme reactie (schrikken, stress) hierop.

-Ademhaling: er wordt gelet op zichtbare afwijkingen aan de ademhaling, bv moeizame of heel snelle ademhaling.

Pijnstilling: Adequate pijnstilling wordt gegeven voordat de dieren onder narcose gebracht worden.

Pijnbestrijding vindt plaats op de dag van het aanbrengen van de wonden en indien nodig bij verbandwissel.

Herhaling van anesthesie vindt plaats bij verbandwissels en wondinspectie

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Solitaire huisvesting.

Beperktere bewegingsvrijheid door verband

Diabetes (alleen bij db/db muizen)

Dagelijkse injectie bleomycine (alleen bij WTfibr muizen)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Voorkomen van risico op aanvreten verbandmiddelen en wonden.

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

Er is kooiverrijking en drinkwater en voedsel zijn vrij verkrijgbaar.

### **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.

Indien er sprake is van apatisch (eet)gedrag, verminderde drinkwaterinname (gewichtsverlies van meer dan 20%) of een wondinfectie die de wondgenezing ernstig verstoort.

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

Wij hebben zelf nog weinig ervaring met deze dieren, maar afgaande op de literatuur en consultatie van collega onderzoekers verwachten we < 10% uitval.

### **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.

Cumulatief is er sprake van het volgende ongerief:

Solitaire huisvesting: licht ongerief (100% van de dieren)

Diabetes ontwikkeling (db/db) muizen: licht ongerief (1/3 van de groep)

Bleomycine injecties (dagelijks): matig (1/3 van de groep)

Injecties tbv pijnbestrijding: licht ongerief (100% van de dieren)

Aanbrengen wonden onder anesthesie: matig ongerief (100% van de dieren)

Herhaalde anesthesie tbv behandeling en verbandwissel (max. 10 handelingen): matig ongerief (100% van de dieren)

Doden d.m.v. CO2: terminaal

Cumulatief: Matig ongerief voor 100% van de dieren in de proef.

| soort ongerief  | kwalificatie   | % van de dieren |
|---|----------------|-----------------|
| Solitaire huisvesting   | Licht ongerief | 100%            |
| Diabetes ontwikkeling   | Licht ongerief | 33%             |
| Bleomycine injecties  | Matig ongerief | 33%             |
| Injecties pijnbestrijding                                     | Licht ongerief | 100%            |
| Aanbrengen van de wonden onder anesthesie                     | Matig ongerief | 100%            |
| Herhaalde anesthesie tbv verbandwissels (max. 10 handelingen) | Matig ongerief | 100%            |
| Doden onder anesthesie  | Terminaal      | 100%            |
| Cumulatief  | Matig          | 100%            |

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Bij einde experiment worden de (gezezen) wonden uitgesneden voor nadere histologische en immunohistochemische 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.

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 11400
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Vrije Universiteit Medisch Centrum Amsterdam
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 2          | Behandeling van wonden in varkens met PRP producten en [REDACTED] |
- 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.

Om de translatie naar humane toepassing beter te kunnen maken worden er experimenten op varkens uitgevoerd. De structuur van de huid komt meer overeen met de humane huid dan van knaagdieren, bovendien verloopt het genezingsproces in het varken vergelijkbaar met de genezing van wonden bij de mens. Bij deze experimenten wordt het effect van PRP formuleringen en [REDACTED] op de wondgenezing bestudeerd. Tevens wordt onderzocht welke formulering cq toedieningswijze/verband techniek het best gebruikt zou kunnen worden. Het doel is een toedieningswijze/verbandstelsel te ontwikkelen voor de PRP en [REDACTED] eventueel in combinatie met andere middelen die ook klinisch toepasbaar is. Doordat er op de flanken van het varken meerdere type wonden gemaakt kunnen worden (partiële diepte of volledige diepte, excisie- of brandwonden) kunnen er verschillende behandelingen (mits systemische effecten uitgesloten kunnen worden) op één dier getest worden. De interindividuele variatie wordt hiermee gereduceerd, waardoor bv intra-individuele statistische testen uitgevoerd kunnen worden en er uiteindelijk minder dieren behandeld hoeven te worden.

Als primaire uitkomstmaat wordt gekeken naar uitkomst van wondgenezing (effectiviteit), de tijd tot re-epithelialisatie van de wond (wondgenezing) en mate van littekenvorming. Dit zal zowel macroscopische beoordeeld worden (contractie, roodheid en littekenvorming) als histologisch (ontsteking en dermale regeneratie).

Afhankelijk van de uitkomsten van de experimenten bij de muizen (zie bijlage 1) zullen een klein aantal maximaal 4 verschillende formuleringen worden toegepast in varkens.

Het effect van de PRP formuleringen en █████ zijn al uitvoering in in vitro modellen onderzocht. Omdat een immuunreactie in vitro ontbreekt, is het noodzakelijk dit in vivo te testen. In muizen zal de genezingscapaciteit door PRP formuleringen in verschillen wondtypen onderzocht worden (zie bijlage 1). Aangezien belangrijke aspecten van de wondgenezing in muizen minder goed vergelijkbaar zijn met die in de mens, is het van belang het effect op de wondgenezing (dit kan alleen op acute en fibrotische wonden) en de optimale wijze van toediening en verbandtechniek in het varken te bestuderen. Het varken is hier, op basis van eerdere experimenten, een geschikt proefdier voor. Voor █████ zullen ten eerste partieel diepe excisiewonden toegepast worden, en vervolgens zullen brandwonden getest worden om ook de rol van de brandwondenkorst (eschar) te kunnen bestuderen. In theorie zou de brandwondenkorst de effectiviteit van █████ kunnen verminderen. In diepe excisie wonden welke klinisch altijd behandeld zullen worden met een huidtransplantaat zal vervolgens het effect van █████ op overleving van het transplantaat getest worden. Het effect van █████ op de wondgenezing wordt bepaald op verschillende tijdstippen. Om de effecten van PRP formuleringen te testen in diepe excisiewonden met huidtransplantaten wordt als primaire uitkomstmaten de tijd tot re-epithelialisatie gemeten. Door het nemen van biopten zullen ook de angiogenese (CD31) epitheel vorming (pan-keratine, VEGF) en fibrose (alpha Smooth Muscle Actine) bestudeerd 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.

Voorafgaand aan de behandeling wordt adequate pijnstilling toegediend. Op de flanken van Yorkshire varkens worden onder adequate anesthesie de experimentele gebieden getatoeëerd. De tatoeage dient om gedurende het experiment wondgenezing te kunnen onderscheiden van contractie, en om te kunnen corrigeren voor de (aanzienlijke) groei van het dier. Het mechanisme van wondgenezing (uitgroei van epitheel) in het varken lijkt sterk op dat in de mens, en is afwijkend van dat in knaagdieren (genezing door wondcontractie). Juist daarom is deze parameter belangrijk om te kunnen kwantificeren. Om te voorkomen dat de tatoeage inkt in de open wonden terecht komt worden een week later per flank maximaal 7 excisie wonden gemaakt (3 x 3 cm), deze procedure vindt plaats onder algehele anesthesie. De wonden worden op gestandaardiseerde wijze aangebracht. Dit kunnen excisiewonden zijn van partiële of volledige diepte van de huid. Bij de dieren waarbij brandwonden worden aangebracht wordt de tatoeage uitgevoerd op de dag van het aanbrengen van de wonden. Dit kan wel op de dag van de ingreep omdat er hier geen open wonden zijn en er dus geen risico op inkt in de wonden komt en de dieren toch al onder algehele narcose gebracht worden. De brandwonden worden op gestandaardiseerde wijze aangebracht en kunnen ook van partiële of volledige diepte zijn. Bij volledige diepe brandwonden wordt het necrotisch weefsel na 14 dagen geëxcideerd en getransplanteerd met een split skin graft conform de klinische praktijk. De behandeling met PRP start na transplantatie. Behandeling met █████ start direct na het aanbrengen van de brandwond.

Voor het testen van producten die de wondgenezing stimuleren worden de verschillende producten na aanbrengen van de wonden aangebracht, de eerste applicatie kan direct gedurende dezelfde procedure zijn of tot ongeveer 24 h later. De behandeling kan herhaald worden tot de wond gesloten is. De frequentie van toediening wordt bepaald in eerdere (muizen) experimenten.

█████ wordt opnieuw aangebracht indien het de wond niet volledig afsluit. Dit wordt gebaseerd op visuele waarnemingen.

Op verschillende tijdstippen (tijdens de behandelingen rond dagen 1, 2, 4, 7 en 14 en tijdens follow up na ongeveer 21, 28 en 56 dagen) worden de wonden beoordeeld en worden er foto's, biopten en/of bloed afgenomen. Aan het einde van het experiment (rond dag 56) worden de dieren geofferd en wordt de volledige wond uitgesneden. Indien de proefopzet daarom vraagt kunnen evt. latere tijdpunten opgenomen worden (tot max 6 maanden).

---

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

Voorafgaand aan de dierproeven is door middel van in vitro proeven reeds bepaald welke concentraties en bestanddelen nodig zijn voor de behandeling van PRP. Daardoor hoeven geen dieren gebruikt te worden voor het uittesten van werkzame doses. Het uiteindelijke effect in vivo dient echter wel in dieren getest te worden, aangezien in vitro niet de invloed van een actief immuunsysteem en bloedcirculatie getest kan worden. Met behulp van deze resultaten zal het uiteindelijke aantal te behandelen wonden en dieren bepaald worden.

Aangezien het nieuwe producten betreft hebben we nu nog geen gegevens om sample size berekeningen heel precies uit te kunnen voeren. We verwachten voor het testen van verschillende PRP formuleringen maximaal 15 varkens nodig te hebben.

Voor het testen van [REDACTED] denken we 6 varkens nodig te hebben voor het testen van verschillende composities van [REDACTED] op verschillende typen wonden.

Voor de combinatie van PRP en [REDACTED] denken we nog eens 6 varkens nodig te hebben.

---

## **B. De dieren**

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

Er wordt voor varkens gekozen omdat de huid en wondgenezing van varkens grote overeenkomsten vertoont met die van de mens. Ook de wijze van verbinden van wonden is voor het beoordelen van de producten die wij willen testen van groot belang. In het varken kunnen wij de wonden verbinden op identieke wijze als bij de mens. Dit is in bv knaagdieren technisch niet mogelijk.

Soort: Yorkshire varkens

Leeftijd/gewicht: 6-12 weken. Voor deze leeftijd wordt gekozen vanwege het te verwachten hogere gewicht van oudere dieren, waardoor het moeilijk wordt deze nog goed te hanteren en verbinden.

Afhankelijk van huisvestingsmogelijkheden en in overleg met het proefdierinstituut zal gekozen worden voor vrouwelijke of een mix van vrouwelijke en mannelijke dieren.

De voorkeur gaat uit naar vrouwelijke dieren vanwege praktische aspecten (de penis zit onder het verband en geeft problemen bij het plassen). Daarnaast ontstaat er geen overschot van één geslacht omdat mannelijke dieren verkocht worden aan fok bedrijven of KI stations, of geslacht worden voor consumptie.

Herkomst categorie: erkende leverancier

Geschatte aantal: (totaal voor het hele project) 27

De behandelingen moeten op minimaal 3 dieren worden uitgevoerd vanwege individuele verschillen tussen de varkens. Per dier worden max 14 excisiewonden (7 op elke flank) of 12 brandwonden (6 per flank) aangebracht.

1.3: PRP: maximaal 15 varkens

We testen 4 PRP formuleringen en een controle behandeling. Per dier worden op 6 partiële diepte en 6 volledige diepte (brand) wonden verdeeld over twee flanken behandeld. De volledig diepe brandwonden worden na 2 weken geëxcideerd conform de klinische praktijk. Omdat er zich systemische effecten kunnen voordoen van de groeifactoren die in de PRP-preparaten voorkomen, wordt elk dier met maar 1 formulering behandeld. Met 3 dieren per formulering brengt dat dat het aantal dieren op 15.

[REDACTED] maximaal 12 varkens

2.1 Partiële diepte wonden excisie voor ontwerp verbandsysteem met en zonder bacterieload: testen van elk 3 varianten per dier met en zonder bacteriën (elke variant minimaal in duplo), elk in 3 dieren= 3 varkens

2.2 en 2.3 Partiële diepte, en volledig diepte brandwonden, excisie en transplantatie, voor effect wondgenezing:

Per dier worden op 6 partiële diepte en 6 volledige diepte (brand) wonden verdeeld over twee flanken aangebracht.

---

Voor de brandwonden gaan we uit van 6 wonden per flank, er zijn dan 3 variabelen (in duplo) per flank te testen. In totaal zijn hiervoor 3 dieren nodig.

3. Testen aanpassingen ██████ in combinatie met 2 varianten PRP en een standaard behandeling als controle: 2 series van elk 3 dieren. 3 dieren per variant PRP, = 6 varkens.

Er is gekozen voor meerdere wonden per dier waardoor het aantal dieren aanzienlijk verminderd kon worden. Het aanbrengen van meerdere wonden per dier zal het ongerief waarschijnlijk iets doen toenemen per dier maar niet recht evenredig met het aantal wonden. Door het aantal dieren te verhogen en het aantal wonden per dier te verminderen zou voor een groter aantal dieren leed betekenen.

### 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

De gekozen behandelmethoden zijn in vitro al onderzocht. Omdat een immuunreactie in vitro ontbreekt, is het noodzakelijk dit ook in vivo te testen. Een aantal aspecten zal in muizen worden onderzocht zoals samenstelling en dosering bij verschillende wondtypen (zie bijlage 1). Deze resultaten zullen in het varken bevestigd worden in het fibrotische wondtype omdat in het varken een chronisch wondmodel niet mogelijk is. ██████ is een compleet nieuwe verbandstelsel, deze wonddressings worden eerder getest in in vitro proeven en in muizen (██████). In het varken kan een volledig wonddressings systeem ontwikkeld worden (inclusief genezingsbevorderende en antibacteriële componenten) dat bij de mens gebruikt kan worden. Het is noodzakelijk dit in het varken uit te testen, aangezien knaagdierverbandmiddelen zoals die in de kliniek gebruikt worden niet/slecht toelaten. Er is ruime ervaring met het aanbrengen van dergelijke wonddressings systemen uit eerdere studies.

#### Vermindering

Door meerdere (maximaal 14) wonden per dier aan te brengen, kunnen er verschillende behandelingen en wonddressings per dier worden getest. Het aanbrengen van meerdere wonden per dier levert dat ieder dier ook zijn eigen controle is, er zijn dus geen aparte controle groepen nodig. In het verleden hebben we ruime ervaring opgedaan met dit aantal wonden per varken.

Meerdere parameters worden in hetzelfde varken gemeten. Door het aanbrengen van meerdere wonden per varken kan het aantal dieren verminderd worden. Hoewel het ongerief per varken waarschijnlijk iets toeneemt zal het totale ongerief bij meerdere wonden per dier niet evenredig toenemen met het aantal wonden.

### Verfijning

Er wordt gebruikt gemaakt van humane eindpunten (zie J), adequate pijn stilling, anesthesie door getraind personeel. Hierdoor zal uitval van dieren zoveel mogelijk worden voorkomen.

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.

Voorafgaand aan de behandeling zal adequate pijnstilling worden toegepast, deze wordt na de ingreep en zolang nodig herhaald. Alle handelingen die pijn kunnen veroorzaken vinden plaats onder algehele narcose. De dieren worden naast elkaar (maar solitair) gehuisvest, er is kooiverrijking en evt. achtergrondmuziek in de stal. Drinkwater is vrij beschikbaar.

## 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 studies betreffen recent ontwikkelde nieuwe producten dan wel prototypes. Op grond van beschikbare literatuur en communicatie met mensen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van deze producten is vastgesteld dat de nu voorgestelde studies niet eerder zijn uitgevoerd.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De varkens worden solitair gehuisvest, de dieren worden naast elkaar gehuisvest, ze kunnen elkaar wel ruiken en er is kooiverrijking. Er is geen direct contact met soortgenoten, dit is noodzakelijk omdat de dieren anders aan elkaars wonden en verbanden zouden kunnen knagen.

### 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.

Voorafgaand aan de ingreep wordt een passende pijnstilling i.m. toegediend, gedurende de ingreep die onder volledige narcose plaats vindt wordt dit herhaald, na afloop en gedurende 14 dagen volgend op de ingreep wordt pijnstilling (op de meest geschikte wijze, bv via een pleister) toegepast. Alle handelingen die pijn kunnen veroorzaken vinden plaats onder algehele narcose.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De dieren worden vanaf de eerste ingreep in het experiment solitair gehuisvest, maar wel naast elkaar, zolang er verband noodzakelijk is.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Geen direct contact met soortgenoten, noodzakelijk ivm risico op aanvreten van verbandmiddelen en wonden.

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

De dieren worden naast elkaar gehuisvest, zodat minimaal contact tussen de dieren mogelijk is. Drinkwater en voedsel zijn vrij verkrijgbaar. Er is kooiverrijking en evt. achtergrondmuziek in de stal.

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Voor het bepalen van pijn wordt er gelet op hoe de dieren reageren: alert, geïnteresseerd en nieuwsgierig, of stil, apathisch of humeurig. Daarnaast worden veranderingen in voedsel opname en loop patroon gebruikt als indicaties voor pijn.

Het experiment wordt voortijdig beëindigd indien het dier slecht eet of apatisch gedrag vertoont, of algemene verschijnselen van ziekte. In eerste instantie zal dan getracht worden de oorzaak te bestrijden bv door het geven van extra pijnstilling en/of andere medicijnen indien de opzet van het experiment dit toelaat. Dit wordt beoordeeld door de onderzoeker, de proefdierdeskundige en/of dierenarts.

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

Op basis van onze ervaring verwachten we geen uitval van dieren.

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

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

Cumulatief is er sprake van het volgende ongerief:

Solitair huisvesting: licht ongerief (100% van de dieren)

Injecties tbv pijnbestrijding: licht ongerief (100% van de dieren)

Aanbrengen wonden onder adequate anesthesie (intubatie) en pijnbestrijding: matig ongerief (100% van de dieren)

Herhaalde anesthesie (tot 7x) tbv behandeling, nemen van biopten, bloedafname en verbandwissel: matig ongerief (100% van de dieren)

Doden onder anesthesie: terminaal

Cumulatief: Matig ongerief voor 100% van de dieren in de proef.



| soort ongerief                            | kwalificatie   | % van de dieren |
|---|----------------|-----------------|
| Solitaire huisvesting                     | Licht ongerief | 100%            |
| Injecties pijnbestrijding                 | Licht ongerief | 100%            |
| Aanbrengen van de wonden onder anesthesie | Matig ongerief | 100%            |
| Herhaalde anesthesie tbv verbandwissels   | Matig ongerief | 100%            |
| Doden onder anesthesie                    | Terminaal      | 100%            |
| Cumulatief                                | Matig          | 100%            |

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Aan het einde van het experiment worden de wonden volledig uitgesneden voor verder onderzoek. Omdat we van elke wond een deel van de gezonde huid en een groot deel van het litteken histologisch willen onderzoeken zouden er grote en diepe wonden ontstaan met risico op infecties en complicaties.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

T.a.v. [REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED] AMSTERDAM

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD114002017853

**Bijlagen**

2

Datum 1 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 februari 2017. Het gaat om uw project "Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002017853. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). 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

**Datum:**

1 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017853

**Datum:**  
1 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017853

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400  
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 64156338  
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117  
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM  
IBAN: [REDACTED]  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Onderzoeker in opleiding  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Datum:**  
1 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017853

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

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 april 2017  
Geplande einddatum: 1 april 2022  
Titel project: Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden  
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe therapieën voor verbeterde wondgenezing  
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medische Centrum  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Datum:**

1 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017853

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.287,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Amsterdam  
Datum: 1 februari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD114002017853

**Bijlagen**

2

Datum 1 februari 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 februari 2017

Vervaldatum: 3 maart 2017

Factuurnummer: 170853

| Omschrijving   | Bedrag     |
|--|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD114002017853 | € 1.287,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD114002017853

Datum 20 februari 2017  
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 1 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden" met aanvraagnummer AVD114002017853. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Onduidelijkheden**

De CCD is van mening dat het ongerief voor het toebrengen van de brandwonden in de varkensstudie als ernstig ingeschat zou moeten worden. U heeft het ongerief als matig ingeschat. Kunt u dat beargumenteren?

In de aanvraag staat dat tijdens de uitvoering van het project bekeken zal worden of pijnbestrijding strijdig is met het behalen van de doelstelling. Wij vragen u om als onderdeel van de aanvraag te beargumenteren of de doelstelling het wel of niet toelaat. Indien niet strijdig met doelstelling dan wil de CCD als voorwaarde aan de vergunning toevoegen dat ook aan continue pijnbestrijding wordt gedaan. Indien u het daar niet mee eens bent kunt u daarop reageren.

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.

**Datum:**

20 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017853

**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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



## Melding bijlagen

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

### 1 Uw Gegevens

Naam instelling: Vrije Universiteit Medisch Centrum

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD114002017853

### 2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

**Datum:**

20 februari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017853

**3 Ondertekening**

Naam: .....

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

Handtekening: .....

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:  
Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 24 februari 2017 13:43  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD114002017853

Geachte [REDACTED]  
Ik heb het antwoord ontvangen en het is nu geheel duidelijk. Wij gaan ook mee met de argumentatie.  
Ik zal de beschikking opmaken. De vergunning komt dan in de eerste helft van volgende week naar u toe.

Met vriendelijke groet,

Met vriendelijke groet,

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

.....  
Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....

.....  
Gelieve email over projectaanvragen te richten aan: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 23 februari 2017 10:38  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD114002017853

Geachte CCD,

Naar aanleiding van uw onderstaande mail hebben we deze vraag binnen de DEC en IvD besproken, hierbij hebben we ook de betrokken onderzoekers en biotechnici geraadpleegd.

Ons antwoord hebben we vandaag via de beveiligde NetFTP verbinding naar u opgestuurd. Onder: AVD\_11400 met de naam: Antwoord CCD Brandwonden Varken\_final\_AVD114002017853.pdf.

We hopen hiermee de vraag van de CCD voldoende te hebben beantwoord, wanneer er aanvullende informatie nodig is horen we dat graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
[REDACTED]  
Secretaris DEC en IvD VU-VUmc  
Arbo & Milieu



[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
BEZOEKADRES: [REDACTED] Amsterdam | [Disclaimer](#)

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** maandag 20 februari 2017 11:40

To: [REDACTED]

Subject: FW: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD114002017853

Geachte DEC Vrije Universiteit / VU Medische Centrum,

Op 01-02-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden' met aanvraagnummer AVD114002017853.

De CCD is van mening dat het ongerief voor het toebrengen van de brandwonden in de varkensstudie als ernstig ingeschat zou moeten worden. U bent met de inschatting van het ongerief als matig akkoord gegaan. Kunt u dat beargumenteren? De CCD heeft richting de aanvrager gevraagd om, als onderdeel van de aanvraag, te beargumenteren of adequate pijnbestrijding strijdig is met de doelstellingen, en indien dit niet het geval is, pijnbestrijding toe te passen.

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
Centrale Commissie Dierproeven

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

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

.....  
T: 0900 2800028

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

## Antwoord DEC en IvD VU/VUmc bij projectvoorstel AVD114002017853

Geachte [REDACTED]

Beneden treft u de antwoorden op de CCD vragen aan, die met alle betrokkenen bij het toetsen van CCD voorstel AVD114002017853 zijn uitgewerkt. Bij de inschatting van het ongerief en de details van uitvoer zijn zowel de onderzoekers, de IvD als de DEC betrokken.

De CCD is van mening dat het ongerief voor het toebrengen van de brandwonden in de varkensstudie als ernstig ingeschat zou moeten worden. Wij zijn met de inschatting van het ongerief als matig akkoord gegaan. De redenen hiervoor zijn de volgende:

1. Aangezien 'full-thickness' wonden worden aangebracht (excisie, contact verbranding dan wel heet water verbranding) zijn de zenuwuiteinden verwijderd (excisie) of vernietigd (verbranding) waardoor er geen gevoel (pijn) meer is in de wond. Aan de wondranden zal wel pijn worden ervaren, maar dat is met name bij mobiliteit van de wondrand. Aangezien ze stevige verbanden dragen is dit minimaal.

2. De CCD heeft richting de aanvrager gevraagd om, als onderdeel van de aanvraag, te beargumenteren of adequate pijnbestrijding strijdig is met de doelstellingen, en indien dit niet het geval is, pijnbestrijding toe te passen.

Pijnbestrijding is zeker niet strijdig met de doelstelling en wordt nauwkeurig toegepast: Voor het aanbrengen van de brandwonden, beginnen we met oraal NSAID (meloxicam) en een Fentanyl pleister op het oor. De NSAID wordt gedurende twee tot drie weken 1 x daags vervolgd, en de Fentanyl pleister kan elke drie dagen vervangen worden zolang als nodig. Pijnbestrijding gebeurt oraal en transdermaal, en dit is naar onze mening een duidelijke verbetering in vergelijking met vroegere methodes zoals dagelijks inspuiten. De varkens vallen gedurende het experiment niet af, zijn tam, speels en reageren niet op aanraking van de wonden. De dieren groeien goed, zijn niet bang, zijn aanhankelijk en vertonen, na het wennen aan de individuele huisvesting, natuurlijk gedrag.

3. Bij een onderzoek met dezelfde methodiek bij varkens die al door de CCD in 2016 is goedgekeurd (AVD114002016601) was destijds de inschatting van het ongerief ook 'matig' en wij zien geen reden waarom dit in het nieuwe CCD voorstel anders zou moeten zijn.

4. Volgens de EU richtlijn 2010/63/EU, die de CCD zelf hanteert (zie pagina 76-79 voor indeling classificatie), vallen deze handelingen onder de categorie 'matig'.

Concluderend is onze inschatting dus matig.

Met vriendelijke groet,

Namens de DEC voorzitter (VU/VUmc/UvA), de IvD voorzitter en IvD dierenarts (VU/VUmc), de betrokken onderzoekers en de biotechnici betrokken bij de uitvoer van het project.

# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:  
*NVWA nummer 11400*
2. Titel van het project:  
*Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden*
3. Titel van de NTS:  
*Nieuwe therapieën voor verbeterde wondgenezing*
4. Type aanvraag:  
*Nieuwe aanvraag projectvergunning*
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
  - telefoonnummer contactpersoon: 0[REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: *24-11-2016*
  - aanvraag compleet: *24-11-2016*
  - in vergadering besproken: *13-12-2016 en 10-01-2017*
  - anderszins behandeld: *n.v.t.*
  - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
  - aanpassing aanvraag: *21-12-2016 en 12-01-2017*
  - advies aan CCD: *01-02-2017*
7. Afstemming IvD
  - Datum advies IvD: *24-11-2016*
  - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

### Vraagronde 1

- Datum: *14-12-2016*
- Strekking gestelde vragen: *Er is een duidelijkere translatie nodig tussen de gebruikte diermodellen en de praktijk van wondgenezing in patiënten. Graag de typen wonden per stap benoemen. De plaatjes-rijk plasma producten, hoe wordt dit precies toegediend? Wees consequent met de aantallen, dit komt nu niet altijd overeen tussen het voorstel en de bijlagen dierproeven. Noem in de bijlagen duidelijk het scenario per dier, welke handelingen ondergaat een individueel dier precies?*
- Datum antwoord: *21-12-2016*

- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven. De aanvraag zal besproken worden tijdens de plenaire vergadering van 10 jan.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

#### Vraagronde 2

- Datum: *11-01-2017*
- Strekking gestelde vragen: *Enkele tekstuele opmerkingen. Daarnaast ziet de DEC graag een tabel waarin men de typen wonden opsplijt.*
- Datum antwoord: *12-01-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

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

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

1. *Is het project vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. n.v.t*

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

1. *Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

*Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. *Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie translationeel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

### **Belangen en waarden**

4. *Het directe doel van deze studie is nieuwe strategieën/behandelmethodes te ontwikkelen voor de verbetering van wondgenezing van verschillende typen wonden in diermodellen (zowel acute als chronische wonden). Daarnaast wordt de meest geschikte toedieningsvorm en wijze van verbinden getest.*



*Het uiteindelijke doel is deze nieuwe strategieën/behandelmethodes toe te passen in de kliniek voor verbetering van wondgenezing bij patiënten. Wondgenezing is een complex proces waarbij vaak complicaties optreden, wat kan resulteren in ernstige littekens of wonden die niet genezen. Door ontwikkeling en uiteindelijk toepassing van de innovatieve behandelingen die hier beschreven worden, kunnen patiënten sneller genezen en kunnen pijnlijke verbandwissels verminderd worden. Dit zal de kwaliteit van leven voor de patiënt verbeteren en kan kostenreductie in de zorg opleveren.*

*Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.*

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

*De belangrijkste belanghebbenden in dit project, dat gericht is op de ontwikkeling van strategieën/behandelmethodes voor de verbetering van wondgenezing, zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.*

*De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Nieuwe effectievere behandelmethodes voor verbeterde wondgenezing.*

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: n.v.t.

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn.

*Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er samengewerkt met de andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

*De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. Deze inzichten kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van nieuwe effectievere behandelmethodes voor verbeterde wondgenezing. De*

*gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de gezien de logische opbouw van het onderzoek.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

*Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwefdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.*

10. *De dieren worden over het algemeen gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Echter om er zeker van te zijn dat het verband intact blijft, is het noodzakelijk om alle dieren solitair te huisvesten vanaf de eerste ingreep tot het einde van de proef. De dieren kunnen anders bij elkaar het verband of de wond(-korst) stukmaken. Kooiverrijking wordt toegepast om de negatieve effecten van solitaire huisvesting tegen te gaan.*

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geëvalueerd.

*Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geëvalueerd.*

*Alle dieren, varkens en muizen, zullen maximaal matig ongerief ervaren. De dieren ondervinden licht ongerief als gevolg van solitaire huisvesting, injecties voor pijnbestrijding en doden onder anesthesie. Sommige muizen zullen ook diabetes ontwikkelen (diabetes muismodel; model voor chronische wonden) wat zorgt voor licht ongerief. Matig ongerief wordt bij alle dieren verwacht als gevolg van aanbrengen van wonden onder anesthesie en herhaalde anesthesie t.b.v. verbandwissels. Daarnaast zullen bij de muizen de bleomycine injecties (fibrotisch muismodel; model voor acute wonden) zorgen voor matig ongerief.*

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren operaties ondergaan, bij de dieren zullen gedefinieerde wonden worden aangebracht. De dieren krijgen dezelfde pijnbestrijding als patiënten met wonden, maar desondanks kunnen ze toch pijn en jeuk ondervinden. Bovendien kunnen de dieren ongerief ondervinden door injecties, solitaire huisvesting en als gevolg van diabetes of fibrose.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken.

*De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht, gedrag of algehele malaise. Men zal de humane eindpunten toepassen indien er sprake is van apatisch (eet)gedrag, verminderde drinkwaterinname, gewichtsverlies van meer dan 20% of een wondinfectie die de wondgenezing ernstig verstoort. Men verwacht deze humane eindpunten bij maximaal 10% van de muizen toe te passen. Op basis van ervaring verwachten de onderzoekers geen uitval bij de varkens.*

**3V's**

14. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdier vrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

*Men maakt zoveel mogelijk gebruik van proefdier vrije alternatieven en tijdens de in vitro testen wordt bepaald welke producten getest zullen worden in een diermodel. Wondgenezing is echter een complex proces, waarvan niet alle facetten in vitro onderzocht kunnen worden. Zo zijn er in vitro bijvoorbeeld geen ontstekingscellen aanwezig en kan er geen verbandtechniek worden getest. Daarom moet de werking van deze producten in een diermodel onderzocht worden.*

*De keuze voor het gebruik van muizen en varkens is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Men kiest voor het gebruik van muizenmodellen, omdat daarin bepaalde ziektebeelden zoals diabetes en littekenvorming opgewekt kunnen worden. De dieren met diabetes vertonen net als bij de mens een vertraagde wondgenezing, waardoor de effecten van de verschillende producten bij chronische wondgenezing kunnen worden onderzocht. In de vervolggexperimenten kiest men voor het varken, omdat de behandeling van varkenswonden meer aansluit bij de klinische praktijk dan de behandeling van knaagdieren. De anatomie van de huid en het proces van wondgenezing van het varken komt grotendeels overeen met die van de mens, daardoor is het mogelijk verbandtechnieken te gebruiken die direct te vertalen zijn naar gebruik bij de mens.*

15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

*Voordat de dierexperimenten worden uitgevoerd zijn de behandelingen uitvoerig in laboratoriummodellen getest, alleen de kansrijkste behandelingen worden vervolgens in dieren onderzocht. Waar mogelijk zal men meerdere wonden op één dier aanbrengen, waardoor minder dieren gebruikt worden en waarbij het lijden per dier nauwelijks toeneemt. Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt.*

*Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 648 muizen en 27 varkens en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

16. 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.

*Passende anesthesie en pijnbestrijding zullen de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Verder zullen de dieren dagelijks beoordeeld worden en indien het dier het humaan eindpunt bereikt zal het uit de proef worden genomen. Alle experimenten zullen worden uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel.*

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over

voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt: *n.v.t.*

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

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

*Voor de muizen geldt dat zowel vrouwelijke als mannelijke dieren zullen worden gebruikt. Voor de varkens zal gekozen worden voor vrouwelijke dieren of een mix van vrouwelijke en mannelijke dieren, afhankelijk van de huisvestingsmogelijkheden en in overleg met het proefdierinstituut en de IvD. Daarbij gaat de voorkeur uit naar vrouwelijke dieren vanwege praktische aspecten, bij mannetjes zit de penis onder het verband en dit geeft problemen bij het plassen. Daarbij zal geen overschot ontstaan van één geslacht, omdat mannelijke dieren verkocht worden aan fokbedrijven of KI stations, of geslacht worden voor consumptie.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).

*De dieren worden gedood om hun weefsel, en de wonden, verder te kunnen analyseren.*

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

*Dit is niet mogelijk omdat er een post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.*

### **NTS**

21. *De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

*Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?*

*Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:*

*Rechtvaardigt de ontwikkeling van nieuwe strategieën/behandelmethodes voor de verbetering van wondgenezing het gebruik van maximaal 648 muizen en 27 varkens in de dierproef die daarvan maximaal matig ongerief ondervinden?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

*De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren.*

*De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: veel voordeel omdat de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van nieuwe strategieën/behandelmethodes voor de verbetering van wondgenezing.*

*De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 648 muizen en 27 varkens die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor de ontwikkeling van nieuwe behandelmethodes om wondgenezing te verbeteren is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het ontwikkelen van nieuwe strategieën/behandelmethodes voor de verbetering van wondgenezing. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een effectievere behandelmethode voor wondgenezing is afgewogen tegen het, als maximaal matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.*

*De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 648 muizen en 27 varkens en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.*

*(1) Het maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandelmethode voor wondgenezing. Het wetenschappelijk belang is reëel, de kennis over wondgenezing zal worden vergroot.*

*(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk belang en het reële wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 648 muizen en 27 varkens en en het daarbij verwachte maximaal matige ongerief.*

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

*De DEC adviseert de vergunning te verlenen.*

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

*Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.*

### 3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

*Er is geen dilemma geconstateerd.*



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD114002017853  
**Bijlagen**  
1

Datum 27 februari 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 1 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden" met aanvraagnummer AVD114002017853. 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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 april 2017 tot en met 31 maart 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de maximale vergunningstermijn 5 jaar is.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medische Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 1 februari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
27 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017853

### **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.

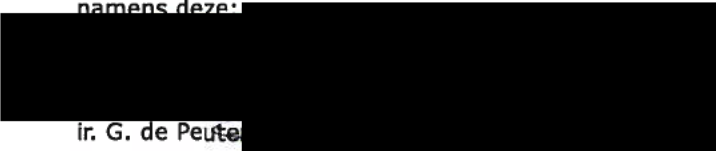
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
ir. G. de Peute  
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: Vrije Universiteit Medisch Centrum  
Adres: de Boelelaan 1117  
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM  
Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 april 2017 tot en met 31 maart 2022, voor het project "Nieuwe innovatieve wondbehandelingen voor de genezing van verschillende typen huidwonden" met aanvraagnummer AVD114002017853, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medische Centrum.

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

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 februari 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 februari 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 februari 2017, ontvangen op 3 februari 2017.

| Naam proef   | Diersoort/ Stam   | Aantal dieren | Ernst      | Opmerkingen |
|--|---|---------------|------------|-------------|
| <b>1: Behandeling van chronische en acute wonden en fibrose in muizen met plaatjes-rijk-plasma (PRP) producten</b> |   |               |            |             |
|  | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Diabetische muizen (db/db): BKS(D)- Leprdb/JOrlRj en wild type muizen C57BLKS/J) | 648           | 100% Matig |             |
| <b>2: Behandeling van wonden in varkens met PRP producten en Heal-X</b>  |   |               |            |             |
|  | Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) / commercieel verkregen  | 27            | 100% Matig |             |

### Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017853

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**  
AVD114002017853

## 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

**Aanvraagnummer:**

AVD114002017853

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.