



06 MAART 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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <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>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>Instantie voor dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein 29</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101, [REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 29	Postbus	9101, [REDACTED]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 29																
Postbus	9101, [REDACTED]																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(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.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | Instantievoor Dierenwelzijn | |
| 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 | 0 2 . 0 4 . 2 0 1 7 |
| Einddatum | 0 1 . 0 4 . 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Nanoparticle imaging agents for cancer therapy
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Toepassing van nanodeeltjes voor kankertherapie.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | RU DEC |
| Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.541,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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



6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam	
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	02 - 03 - 2017
Handtekening	

Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Nanoparticle imaging agents for cancer therapy |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> 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.
-

Cancer therapy

Cancer is one of the main killers of humanity today. It is now increasingly accepted that cancer therapy must be tailored to the individual and the type of cancer, due to the huge amount of heterogeneity involved. Hence, there is now a lot of interest in personalised medicine. This requires the use of noninvasive imaging techniques, in order to monitor and optimise the therapy as needed (for example, to adapt the dosage). In particular, more advanced therapeutics, such as cell therapies, require the use of imaging in order to monitor their localisation and functionality in vivo.

In this project, we plan on further exploring the use of imaging nanoparticles to cancer therapy., focusing on the imaging of cell therapy and the enhancement of tumor ablation therapies. The nanoparticles described here are currently in clinical testing as well.

Nanoparticles in cancer therapy

Polymeric particles have received a lot of attention over the past decades for various applications in nanomedicine, such as drug delivery or multimodal imaging [1][2][3][4][5]. These particles can be loaded, for example, with an imaging agents for imaging applications or with drugs or tumor antigens for therapy, or both. Our department has been working on developing polymeric nanoparticles for both clinical and preclinical use. These nanoparticles are being designed to be used for both the improvement of imaging (polymeric nanoparticles with imaging agents) [6] and therapy [7][8].

We are also producing these particles at GMP grade for an ongoing clinical trial at the Department of Tumor Immunology, thus the nanoparticles are fully expected to be safe for in vivo applications.

The nanoparticles (approx. 200 nm diameter) consist of an FDA-approved polymer, poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA), entrapping a perfluorocarbon and a fluorescent dye. In some cases, the nanoparticle surface may be functionalised with a targeting antibody. This closely mimics the clinical nanoparticles we make, which consist of PLGA and a perfluorocarbon (either perfluoro-15-crown-5-ether or perfluorooctyl bromide) and a fluorescent

dye (either indocyanine or fluorescein). All the nanoparticles used in this entire DEC application will be PLGA-entrapped perfluorocarbon particles as described above. These nanoparticles are inherently suitable as imaging agents for multimodal imaging, particularly with MRI, fluorescence, ultrasound and photoacoustics. Additionally, they seem to be inherently suitable for ablative therapies (based on preliminary data). See figure below for a summary.

Nanoparticles



- GMP-grade in clinical testing
- 200 nm diameter approx.
- Detectable using MRI, ultrasound, fluorescence, photoacoustics
- Suitable for labelling cells (intracellular)

The nanoparticles are detectable using several imaging modalities: Magnetic Resonance Imaging (due to the perfluorocarbon); fluorescence (due to the fluorescent dye); ultrasound and photoacoustics (due to the structure of the nanoparticles).

Thus, through this project, we would like to further develop the nanoparticles for use in cancer therapy, both in imaging therapeutic cells and their ability to enhance tumour ablation, as detailed below.

1. Imaging of cellular therapies

Cellular therapy is the term which describes the transfer of cells to a patient to treat a disease or condition; for example, immune cells can be used to stimulate the immune system against tumors or inflammations [9] . For successful cellular therapy, it is essential that transferred cells are monitored post-transplant noninvasively, longitudinally, and quantitatively, such as by using *in vivo* imaging techniques. Cell tracking consists of following specific cells *in vivo*, this is often in term of their localization, fate, functionality or differentiation, which gives the ability to acquire specific information, for example regarding the number of cells in a region of interest (2). Such information is vital for the optimization and development of cellular therapies.

Although there are close to 30,000 clinical trials involving some form of cell therapy, there are none that have become clear successes. One of the main reasons for this is that it is nearly impossible to monitor cells *in vivo* noninvasively. For example, how do you know if the therapeutic cells have reached the correct location? Are they functional there? How long can they survive?

In order to answer such questions, imaging is essential, because it allows a noninvasive means to monitor cells *in vivo*. In fact, regulatory bodies such as the FDA and EMEA are strongly suggest that imaging be included in cell therapy trials (<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm376136.htm#IV>). There are currently no approved agents for clinical cell tracking, and thus this is an urgent problem. We think these nanoparticles would be strong contenders due to their clinical applicability and suitability for imaging with several imaging modalities.

These nanoparticles are currently in clinical testing for dendritic cell (DC) therapy within our department, but much remains unknown about them *in vivo*, particularly, relating to the fate of the nanoparticles after death of the therapeutic cells. We would like to answer questions regarding the processing and clearance of the nanoparticles and their biodistribution *in vivo* through this DEC. For that we would like to inject free nanoparticles and DCs labelled with our nanoparticles and follow them *in vivo* using imaging techniques, like MRI, photoacoustics and fluorescence imaging. We chose DCs as these cells are essential for cancer therapy and we have already shown that these cells can readily take up the PLGA-PFC nanoparticles.

Technological advances in imaging technologies have produced a variety of approaches for cell tracking and assessing the effects of cells on host tissues in small animals, including: MRI (1H, 19F), nuclear imaging (i.e., SPECT and PET), ultrasound, fluorescence, bioluminescence and photoacoustics (also known as MSOT). However, each modality has some limitations as shown in Table 1. To enable the widest possible reach with the platform and circumvent limitations of individual modalities, here, we will focus on developing probes suitable for MRI, ultrasound and MSOT imaging. Such agents are completely missing currently. As illustrated in the table below, MRI, ultrasound and MSOT imaging represent a powerful combination for non-invasive and safe monitoring of cellular therapies.

Table 1. Each imaging modality has pros and cons; using a multimodal imaging approach, with the nanoparticles described here, overcomes weaknesses and maximises on strengths.

Imaging technique	Clinical use	PROs	CONs	Relevance to cell tracking
Magnetic resonance imaging (MRI): Standard (¹ H)	Established	Non-ionising, high resolution	Expensive, relatively long duration, patient specific issues (implants, movement)	Handful of clinical studies a decade ago, but not pursued further
MRI: ¹⁹ F	Emerging	Non-ionising, quantitative, not limited by half-life decay	Expensive, long durations	One published clinical study thus far (2014); handful more in progress. Technology is limited by availability of cell labels.
Nuclear imaging (PET, SPECT)	Established	Extremely sensitive	Ionising, high cost, invasive, limited by half-life decay, repeated administration for longitudinal imaging	Whole body imaging; may not be suitable for e.g. stem cell due to radiotracers and possible DNA damage
Ultrasound	Established (anatomic)	Cheap, non-ionising, non-invasive, quick bedside scans	Low resolution, operator dependent	No clinical cell tracking work due to absence of suitable labels
Fluorescence	Histological or intra-operative	Low cost, safe, quantitative	Low penetration depth, photo bleaching	Validation of in vivo results in biopsies
MSOT	Emerging (iThera scanners only available)	Non-ionising, non-invasive, low cost	Low imaging depth or poor resolution	Not yet applied to cell tracking due to absence of suitable labels

Here, we will be demonstrating and optimising the use of our imaging nanoparticles (polymer-entrapped perfluorocarbon particles) for the imaging of dendritic cells in mice. We are certain that these data, together with our clinical data, will greatly aid in advancing our understanding of cellular therapies in vivo.

[REDACTED]

[REDACTED]

Finally, the last part of this project involves studying the biodistribution and in vivo fate of the nanoparticles. This is essential for their in vivo use, both for cell tracking and tumour ablation.

Hypothesis

We hypothesise:

- 1) The PLGA nanoparticles will allow imaging of cells for cancer therapy in vivo using imaging (such as MRI, fluorescence, ultrasound, photoacoustics).

[REDACTED]

More information about us or the work we do can be found at <http://www.tumor-immunology.com/>

Previous relevant research to this project

The nanoparticles have been an integral part of research from our department for the last several years, being involved in at least two other DEC's involving imaging. Furthermore, the nanoparticles are now in clinical testing for cell tracking. These GMP-grade nanoparticles are identical to those that will be used in this project, except for differences in the choice of fluorescent dye. The only modifications will be the addition of a targeting antibody or a drug in some parts of this project. Thus, overall, we are confident that the nanoparticles are not toxic and are suitable for multimodal imaging. We have previously shown that the particles are suitable for MRI and fluorescence imaging [3], and now we would like to extend this to ultrasound and photoacoustic imaging [patent pending]. Such imaging is feasible due to the unique facilities at RUMC, namely the PRIME, where all the imaging scanners and animal housing are in the same building.

are injected directly into a lymph node. Thus, no free particles are injected the label is never injected intravenously. This is excellent for a first trial. However, we need to move towards in vivo or in site labelling, where the particles are injected intravenously and are then taken up by specific cells.

Thus, experiments on biodistribution and also the ability of the particles to reach tumours need to be carried out, as described in this proposal. Furthermore, here, we will also test the efficacy of these particles for tumour ablation, based on some promising preliminary in vitro data (figure in section 3.2). We have no in vivo data on this aspect of the particles, although it would be a very exciting and relevant clinical application. Such experiments also require more knowledge of the biodistribution.

Hence, all these experiments are crucial to take us to the next stage of in vivo labelling, thus skipping laborious ex vivo cell culture and labelling steps, and tumour ablation.

The project is funded by an ERC Starting Grant and an ERC Proof of Concept Grant, both focusing on the developing the nanoparticles for therapeutic applications.

References:

- [1] R. N. Mariano, D. Alberti, J. C. Cutrin, S. Geninatti Crich, and S. Aime, "Design of PLGA based nanoparticles for imaging guided applications," *Mol. Pharm.*, vol. 11, no. 11, pp. 4100–6, Nov. 2014.
- [2] G. Strohbehn, D. Coman, L. Han, R. R. T. Ragheb, T. M. Fahmy, A. J. Huttner, F. Hyder, J. M. Piepmeier, W. M. Saltzman, and J. Zhou, "Imaging the delivery of brain-penetrating PLGA nanoparticles in the brain using magnetic resonance," *J. Neurooncol.*, vol. 121, no. 3, pp. 441–9, Feb. 2015.
- [3] M. Srinivas, L. J. Cruz, F. Bonetto, A. Heerschap, C. G. Figdor, and I. J. M. de Vries, "Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using ¹⁹F MRI and optical imaging," *Biomaterials*, vol. 31, no. 27, pp. 7070–7, Sep. 2010.
- [4] M. Figueiredo and R. Esenaliev, "PLGA Nanoparticles for Ultrasound-Mediated Gene Delivery to Solid Tumors," *J. Drug Deliv.*, vol. 2012, p. 767839, Jan. 2012.

- [5] Y.-R. Lee, Y.-H. Lee, S.-A. Im, K. Kim, and C.-K. Lee, "Formulation and Characterization of Antigen-loaded PLGA Nanoparticles for Efficient Cross-priming of the Antigen.," *Immune Netw.*, vol. 11, no. 3, pp. 163–8, Jun. 2011.
- [6] M. Srinivas, A. Heerschap, E. T. Ahrens, C. G. Figdor, and I. J. M. de Vries, "(19)F MRI for quantitative in vivo cell tracking.," *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 7, pp. 363–70, Jul. 2010.
- [7] I. J. M. de V. Srinivas, Mangala, Jurjen Tel, Gerty Schreibelt, Fernando Bonetto, Luis-Javier Cruz, Houshang Amiri, Arend Heerschap, Carl G. Figdor, "PLGA-encapsulated perfluorocarbon nanoparticles for simultaneous visualization of distinct cell populations by 19F MRI," *Nanomedicine*, 2015. .
- [8] L. J. Cruz, P. J. Tacken, I. S. Zeelenberg, M. Srinivas, F. Bonetto, B. Weigelin, C. Eich, I. J. De Vries, and C. G. Figdor, "Tracking Targeted Bimodal Nanovaccines : Immune Responses and Routing in Cells , Tissue , and Whole Organism," *Mol. Pharm.*, 2014.
- [9] A. Al Faraj, N. Luciani, J. Kolosnjaj-Tabi, E. Mattar, O. Clement, C. Wilhelm, and F. Gazeau, "Real-time high-resolution magnetic resonance tracking of macrophage subpopulations in a murine inflammation model: a pilot study with a commercially available cryogenic probe.," *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 8, no. 2, pp. 193–203, Jan. .

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The main goal of this project is to optimize and apply imaging nanoparticles to cancer therapy, through application in cell therapy and tumor ablation.

The project consists of three parts.

1. In vivo tracking of therapeutic cells pre-labelled with nanoparticles (Experiment group 1)
2. Analyzing the fate of nanoparticles after in vivo administration (Experiment group 2)

All Experiment groups will use the same nanoparticles.

The nanoparticles used here are currently in clinical use for imaging therapeutic dendritic cells (DCs) in melanoma patients. Here, we will optimize the nanoparticles in a preclinical model for cell imaging, and also further explore the nanoparticles in vivo, particularly in terms of their biodistribution and their direct therapeutic effect in cancer. The nanoparticles has been previously tested for the ^{19}F MRI cell tracking, [1] thus it is know that there is a possibility to track the nanoparticles and labelled cells in vivo.



[REDACTED]

The research projects range from fundamental to translational. Our group consists of people with both biological and chemical backgrounds, people with animal handling experience, and with an imaging expertise, and stays in close collaboration with fellow scientists of other backgrounds. That gives a strong technical and intellectual input on the various stages of our project. We also have suitable equipment available to carry all the necessary experiments.

[1] M. Srinivas, L. J. Cruz, F. Bonetto, A. Heerschap, C. G. Figdor, and I. J. M. de Vries, "Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using ¹⁹F MRI and optical imaging.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 27, pp. 7070–7, Sep. 2010.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Scientific relevance

The nanoparticles are themselves imaging agents for multimodal imaging (MRI, fluorescence, ultrasound and photoacoustics). Furthermore, the fact that they are currently in clinical use makes them highly exciting. However, their current use has only been partially explored for cell imaging. Here, we will further characterise the particles for tumour ablation. This is a completely new application for such nanoparticles, and is thus very exciting.

The particles and their use for imaging and tumor ablation are currently the subject of 3 patents (pending), as well as several publications. They are also the main subject of various highly competitive grants, including an NWO Veni, and ERC Starting grant and ERC Proof of Concept, and an STW grant. Other than these granted proposals, several more are in process.

Novelty

The project is novel in several ways:

- The use of PLGA-entrapped nanoparticles for imaging with MRI is expected, but their signal in ultrasound and photoacoustics is not. Thus, demonstration of their in vivo utility for relevant applications such as cell tracking, is very exciting.

[REDACTED]

Finally, because we are already able to use the nanoparticles in humans, we are convinced that these agents have very high potential for cancer therapy, and would like to fully explore and exploit them for this purpose.

Societal relevance

There is a clear and urgent need to optimise cancer therapy. These nanoparticles are very likely to be able to contribute to improving cellular therapeutics, and potentially also noninvasive tumor ablation. The relevance of this research is clear. In fact, we are also looking to further this work commercially through a spin-off (this idea won the Dutch Life Sciences Venture Challenge, <http://www.lifesciencesatwork.nl/conquest-winner-of-the-venture-challenge-spring-2015/>), as are convinced of the possible impact of these nanoparticles to personalised medicine. Furthermore, the dual-pronged approach taken here, both cell therapy [REDACTED], is a very power combination. In future projects, we can look into further enhancing the work through, for e.g., combining drug delivery with imaging [REDACTED]. Lastly, because the CCMO has already approved the nanoparticles used in this project for a clinical trial involving the imaging of dendritic cell therapy in melanoma patients, the work is certainly translatable, at least for the part involving cell therapy. Overall, given that cancer is already a leading cause of morbidity and mortality worldwide, with the numbers expected to worsen (WHO statistics: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>), the societal relevance of this project, and the societal benefit if the work is successful, is immense.

3.4 Research Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

The project consists of three parts. All parts of the project use the same nanoparticles, which are suitable for imaging with fluorescence, MRI, ultrasound and photoacoustics; and [REDACTED]

1. In vivo tracking of cells pre-labelled with polymeric nanoparticles containing an imaging agent (Experiment group 1)

The nanoparticles will be added to mouse DCs and incubated before the in vivo administration (the cells take up the nanoparticles). Pre-labelled DCs will be then tracked in vivo using following imaging modalities: ultrasound, photoacoustics, MRI, fluorescence to see whether cell reach a place of interest, e.g lymph nodes or a localised inflammation site. Tracking DCs in vivo will give us a better understanding of cells fate in vivo, regarding their localization and functionality.

These experiments closely mimic the ongoing clinical trial where human DCs are labeled with the same nanoparticles and injected in melanoma patients. We aim to corroborate and expand on the clinical data obtained, to resolve unanswered questions such as what happens to the label after cell death, which cannot be answered through the human trial.

2. Analyzing the biodistribution and clearance of the nanoparticles in vivo (Experiment group 2)

In order to study the fate of nanoparticles after in vivo administration, the nanoparticles will be directly administered into the mouse via foot pad, intravenous or intranodal injections. In a situation, where these types of injection will be insufficient (nanoparticles do not leave the injection site or inability to inject sufficient amount of nanoparticles) we will try further other injection types. The nanoparticles will be either targeted or non-targeted, by functionalising their surface with antibodies or other agents such as radioligands, in order to monitor their biodistribution and clearance in vivo. These data is essential for imaging and tumor ablation applications. Again, these data will be vital to corroborate our human data as the in vivo fate of the nanoparticles cannot be studied in humans.

[REDACTED]

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 three parts of this project aim at giving us answers on how we can optimize cancer treatment, through cell therapy and [REDACTED] Over the course of this project we will use different models and types of assays, which are listed below.

Types of models

Over the course of this project we will use different inducible tumor models: B16 melanoma, 9464D neuroblastoma and EL4 thymoma. Our department and our collaborators have experience with these models, thus the induction characteristics of these models are known (injection concentration, growth characteristics). For our purposes, tumor cells will be injected subcutaneously. For the imaging part of the project, where we will track the cells labelled with nanoparticles, we will also use inducible inflammation models (ear inflammation).

Numbers of models

To answer our questions, we will start our experiments with B16 melanoma model. However, tumors are very heterogeneous, with respect to growth and environment, thus very often, the proof of concepts is required to be confirmed in additional tumor models. That is why the number of different types of tumor models we will use is at most three. Not all experiments will be repeated in the second model though. Each results will be evaluated and the decision on which readout assay will need to be repeated in an alternative model will be made. This decision will be based on whether we see sufficient amount of the imaging agent accumulation within the tumor.

Types of experiments

To determine the effects of the various treatments the following assays will be used. Mice will be monitored at specific time points, with the minimal number needed for statistical significance. Collecting data by techniques such as flow cytometry is necessarily terminal, and increases the numbers of mice required, but no alternatives are available.

1) In vivo tracking of cells pre-labelled with polymeric nanoparticles containing an imaging agent

The nanoparticles containing an imaging agent will be added to mouse DCs and incubated before the in vivo administration. Pre-labelled DCs will be then tracked in vivo using various imaging modalities. We will also use the inflammation model (ear inflammation) to check whether DCs reach the inflammation site.

-donor mice for mouse DCs

-Following pre-labelled DCs in vivo using different imaging modalities (MRI, fluorescent imaging, ultrasound and photoacoustics, at most 5 times within a two week period, and they will be done in a continuous session where the mouse will remain under anesthesia, duration of max. 2h per session per mouse) (All mice that will be used for below assays will be also used here)

-Influx of DCs and related immune cells into the lymphoid organs will be monitored by imaging, and the results validated by established techniques such as by flow cytometry (FACS) and histology

Go/no go decisions will depend on the quality and reproducibility of the data. When the quality appeared good and significance is reached, the results can be trusted and further variants/fine-tuning is not necessary. In this case, we need to be able to reproducibly detect the imaging agent or labeled cells in the relevant region (lymph node or region of inflammation) using in vivo imaging (MRI/fluorescence/ultrasound/photoacoustics), and be able to validate the data using ex vivo analyses, such as histology.

2) Analyzing the fate of nanoparticles after in vivo administration

Here, we will examine the fate of the nanoparticles in vivo after intravenous administration. The same nanoparticles as in the parts 1 and part 3 will be used, except we will also look at the effect of adding a targeting agent to the nanoparticle surface on its biodistribution. The targeting will be either against cell-specific surface markers on DCs or on tumor cells. The nanoparticles will typically be injected just before or after the tumor inoculation, and biodistribution will be monitored through imaging and validated through histology, as in the previous part of this project.

For each tumor cell line we will run a pilot experiment. The purpose of the pilot experiment is to establish the right set up for the experiment and to see what would be the best imaging times needed per each mouse, as this is not known. We believe that carrying out a pilot will help us reduce the overall numbers of mice needed.

-Transfer of nanoparticles encapsulating imaging agents (targeted and non-targeted) and following them in vivo will be monitored using imaging techniques at most 5 times within a two week period, they will be done in a continuous session where the mouse will remain under anesthesia, duration of max. 2h per session per mouse. Each mouse can be imaged with all of these techniques, so that lowers the amount of mice needed per experiment

-In vivo biodistribution of imaging agents will be determined by flow cytometry and histology on excised organs and tissues. The uptake will be studied overtime, thus there is no possibility to combine this and above group

Go/no go decisions will depend on the quality and reproducibility of the results. Here, we need reproducible biodistribution data in both in vivo (imaging) and ex vivo (e.g. histological) analyses. In this project we would like to detect and show the distribution of our nanoparticles, in particular we would like to see if they will accumulate in the tumor. The goal of the experiment 2 is to see whether the nanoparticles will reach the tumor site, while in experiment 3 we would like to study the influence of the presence of nanoparticles [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Total number of animals in the project

Taken together, the total number of animals in the projects will be then 395 mice.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

The particles were originally developed for the imaging of cell therapeutics, and are now also in clinical testing for this application. In this project, we will use the same nanoparticles to study (1) cell therapy, specifically of dendritic cells; (2) biodistribution; and (3) enhancement of tumor ablation. The only modifications to the nanoparticles will be the addition of a targeting antibody in biodistribution studies, and the inclusion of drugs to further enhance tumor ablation.

The studies are all closely linked, and not only because they all use the same nanoparticles (PLGA-entrapped perfluorocarbon particles), but also because all the mouse models aim at improving cancer therapy, whether in dendritic cell therapy or tumor ablation; and tumor ablation therapy itself requires the use of imaging.

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	In vivo tracking of cells pre-labelled with polymeric nanoparticles containing an imaging agent
2	Analyzing the fate of nanoparticles after in vivo administration. The nanoparticles will be non-targeted or targeted to various cells
3	

Appendix**Description animal procedures**

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure In vivo tracking of cells pre-labelled with polymeric nanoparticles containing an imaging agent

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.

In this part we will use the nanoparticles to label immune cells and track the pre-labelled cells through in vivo imaging in order to study their localization, viability, and functionality. These are therapeutic dendritic cells (DCs) as used in cancer therapy. To validate the in vivo imaging data, we will need to carry out standard tests such as histology and flow cytometry.

For that, we will collect cells from donor mice and use those for the labeling with nanoparticles. Pre-labelled cells will be then directly administered into the mouse via foot pad, intravenous or intranodal injections. This will be done under anesthesia. The procedure mimics that used in an ongoing clinical trial using the same nanoparticles, except that the human subjects are not anesthetized during injection of the nanoparticle-labeled dendritic cells.

In some experiments, local inflammation will be induced using an injected agent. This is necessary in order to study the effects of inflammation on cell therapeutics.

Readout parameters in this experimental part will be:

- In vivo cell tracking of immune cells pre-labelled with nanoparticles for imaging. Pre-labelled cells will be tracked in vivo using different imaging modalities (MRI, fluorescent imaging, and photoacoustics). The mice will be imaged at most 5 times within a two week period. Imaging will be done in a continuous session where the mouse will remain under anesthesia, duration of max. 2h per session per mouse. Each mouse can be imaged with all of these techniques, so that lowers the amount of mice needed per experiment. What is more, all these imaging modalities are available within the same laboratory, so logistically doing imaging with several modalities is feasible.

- Mice will be monitored at specific time points, starting with the time of injection.

- To look at the influx of DCs and related immune cells into the lymphoid organs or to the inflammation site mice will be sacrificed to collect the organs and inflamed tissue. Those organs/tissue will be then tested with flow cytometry (FACS) viability assay, and histology. A mouse will be sacrificed at specific time point and organs/tissues will be collected. This will be done to study the influx of cells over time.

Collecting data by techniques such as flow cytometry is necessarily terminal, and increases the numbers of mice required, but no alternatives are available. However, the use of such established techniques is necessary to validate the in vivo imaging data obtained.

Since the nanoparticles are approved for clinical testing, we are confident that they will not prove toxic to the mice. Furthermore, the use of in vivo imaging allows use to reuse each mouse for more than one imaging session, although the sessions will be kept short (2 hours) and sufficiently spaced out (at least 24 hours, and preferably longer) and limited to a maximum of 5 per mouse. This is to reduce any side effects due to anesthesia (isoflurane). Some mice will need to be sacrificed at earlier time points, for validation of the imaging data through histology. Finally, because we are studying the immune system and its response to cancer therapy, we will be able to use only female mice to avoid sex-related differences in their immune systems.

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

Procedures cell tracking

Mouse immune cells will be extracted from donor mice and incubated together with the nanoparticles.

These pre-labelled cells will be then injected via foot pad, intravenous or intranodal injections and followed using multimodal imaging (MRI, fluorescence and photoacoustics) in a limited number of sessions (see Experimental approach).

Ear inflammation will be induced in a group of mice to study the migration of pre-labelled cells to the inflammation site.

In all, we do not expect to follow cells for 2 weeks.

For example, a possible protocol is: Isolation of dendritic cells from donor mice, and then in vitro labeling of these cells. The labeled cells are then injected intravenously in a mouse with ear inflammation (day 0). The mouse is then imaged in vivo on days 1, 3, 7 and 14 using MRI, fluorescence and photoacoustics without waking up during the imaging session. Some mice in the group are sacrificed after imaging at these time points for histological analyses to validate the in vivo imaging data.

Procedures readout assays

Imaging techniques will be used to track the injected cells. The imaging session will include taking an image immediately before injection of cells, and several images after the injection. We envisage that a maximum of five imaging sessions, with a maximum of 1 session per day, over the course of a maximum of 2 weeks will be enough to record changes.

At specific time points post injection (matching the imaging schedule outlined in the example above), some animals will be sacrificed via cervical dislocation. Then organs will be harvested from the mice, after which these tissues are processed further in the lab for analysis via the mentioned platforms (FACS, histology, viability assay). This is to validate the in vivo imaging data.

Procedures to induce localised inflammation

Localised inflammation will be induced through injection of agents such as LPS, possibly mixed in an adjuvant such as Freund's adjuvant. The will be induced either in the ear or in the upper leg of the mouse (only one site per mouse).

Anesthetics

The imaging and cell tracking sessions will involve time isoflurane inhalation. Each animal will stay under anesthesia for max. 2 h per session, max. 5 times over the course of 2 weeks. It is necessary to anaesthetise the mice during imaging, to minimise motion. No pain or other discomfort is expected.

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

The number of mice needed to be able to reach statistical significance will be calculated for each individual experiment using a power analysis. For this we will use the validated software program G-power 3.0.8. The type of statistical test that will be performed is dependent on the nature of the data generated. For instance, comparison of more than two groups, a kaplan meier curve, or a correlation plot all require different statistics. The power that will be used in these tests will be 80%, as this is the lowest number that still gives reliable outcomes, while keeping the numbers of mice

low. Alpha values will be kept at 0.05, while variances needed for these analyses will be estimated based on former experiments or data from literature. If needed (more groups are compared at same time) a bonferroni correction will be taken into account. Former studies helped us in our choice in which tumor model to invest and in which not.

B. The animals

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

Species

For our in vivo experiments we will use wild type mice. Studying the in vivo behavior nanoparticles encapsulating an imaging agents is not possible in 'lower' species. In literature, mice are commonly used to study the in vivo behavior of various polymeric particles. Additionally, the immune system of mice is recognized as sufficiently comparable to the human immune system (when primates are excluded). From an immunological point of view, almost all relevant components that are present in men are present in mice, too.

Origin

We will obtain our mice from registered EU breeding companies, or from our own breeding facility.

Estimated numbers

The total number of animals for these experiments is 150 mice.

- 50 mice to be donors for mouse DCs
- 100 mice for following pre-labelled DCs in vivo and to study the influx of DCs into the lymphoid organs and inflammation sites

Mouse number estimation:

-Donor mice for mouse DCs: The cells cannot be cultured ex vivo, thus cells must be acquired from donors for each experiment. Some cells will also be required to optimise labeling procedures, optimise imaging procedures and study any effects of labeling on the cells. Therefore, an estimate is 15 mice for ex vivo analyses and optimisations, an 35 to provide donor cells for other mice for in vivo imaging = 50 mice.

-In vivo imaging: 2 groups of mice (one inflammation model, non-treated control), (up to 4 routes of injection, e.g. intravenous, subcutaneous, intramuscular or footpad) with 2.5 time points and 4 animals per group= 100 mice.

(2.5 time points calculated as an average, as most mice will not be sacrificed at an imaging time point due to the noninvasive nature of the procedure; however, at each time point some mice will need to be sacrificed to validate the in vivo data using established techniques such as histology)

Life stages

Our experiments will preferably be done in mice younger than 6 months. However, depending on the specific subquestion, sometimes older mice can be valuable too. This will ensure every mouse is well-used. Unless there is a specific explainable need for it, mice will not be allowed to grow older than one year.

Sex

Only female mice will be used as the donor and recipient cells must be a good match. We chose to use only female mice because (1) it is not possible to transfer cells between male and female mice due to the possibility of immune reactions, and (2) strong sex differences in immune reactions are known to occur. [1] Therefore, we chose to use only female mice.

[1] Kovats, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell. Immunol.* 294, 63–69 (2015).

Species wild type mice	Origin commercial supplier/own in house breedings	Maximum number of animals 150	Life stage all ages (except for embryonic)
---------------------------	---	----------------------------------	---

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.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement.

A significant part of our research is being done with in vitro cultures using cell-lines and tissue-like phantoms. However, it is necessary to use animals for further experiments as the in vivo behavior of nanoparticles may differ from in vitro set up. At the moment, it is not possible to mimic this sufficiently in vitro, or with computer models (so without animals).

Reduction.

Our experiments are designed with the minimal number of mice needed to answer the questions in our studies. The minimal group size needed to reach statistical significance will in the majority of cases be calculated using power analyses. In cases where this is not possible we base ourselves on the number of cells needed per experiment, divided by the number of cells that can be obtained per mouse. We strive to make optimal use of the material from each mouse by combining experiments wherever possible.

Refinement.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep the discomfort for the animals as low as possible. The procedures and models we use in this proposal are described in literature to give reliable data. In these models there are currently no methods available to reach further refinement. When opportunities with respect to refinement arise during the course of the project we strive to implement these wherever possible.

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

In addition to the items mentioned under 'refinement' the extra precautions that are taken to reduce pain/stress or other discomfort are:

-Mice will first be made acquainted with the handling by the researcher, before they enter the actual experiment.

-Animals from one group will be housed together as much as possible. Randomization will be done as early in the experiment as possible, and re-randomization will be prevented if the experimental setup allows this. This will prevent unnecessary disturbance of social structures.

-Frequent checking of the animals before and during the experiment will prevent unnecessary discomfort.

- Each mouse can be imaged with all of the imaging techniques within one imaging session, which means the mouse will be anesthetized only once per each imaging session

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Injection of nanoparticle-loaded cells may cause some discomfort. The injections of pre-labelled cells will be followed by imaging sessions, thus the use of anesthesia (isoflurane) is needed to keep the animal still during imaging. The animals may experience some discomfort while recovering from anesthesia. The mice will be imaged at most 5 times within a two week period. Imaging will be done in a continuous session where the mouse will remain under anesthesia, duration of max. 2h per session per mouse. Each mouse can be imaged with all of these techniques, which means the mouse will be anesthetized only once per each imaging session. This can bring the times each mouse will experience a discomfort to a minimum. During long sessions (max. 2 hours) each animal will be closely monitored to prevent any unnecessary discomfort. To prevent sudden drops in mouse body temperature, we will use special heating platforms (when possible). In a situation when we see too low heart beat rate or too low temperature, we will immediately stop the imaging session and help the mouse to recover from anesthesia by warming it up.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Anesthetics:

Imaging with various imaging modalities will be done under general anesthesia using isoflurane.

Analgesics:

The level of pain expected from the injections or imaging sessions will not need the use of analgesics .

Experiment-related forms of discomfort:

- Injection of nanoparticles and cells or therapies
- injection of agents for localised inflammation
- anesthesia

Explain why these effects may emerge.

The adverse effects may result from:

- Injection of nanoparticles and cells or therapies
- inducing localised inflammation
- anesthesia

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

Each mouse can be imaged with all of the techniques we are going to use, which means the mouse will be anesthetized only once per each imaging session. This can bring the times each mouse will experience a discomfort to a minimum. During long sessions (max. 2 hours) each animal will be closely monitored to prevent any unnecessary discomfort. To prevent sudden drops in mouse body temperature, we will use special heating platforms (when possible). In a situation when we see too low heart beat rate or too low temperature, we will immediately stop the imaging session and help the mouse to recover from anesthesia by warming it up.

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.

The humane endpoints as present in the code of practice 'dierproeven in het kankeronderzoek' will be applied. Next to this, the following test specific humane endpoints will be used.

1. There is a significant drop in general condition or cachexia occurs. Loss of weight of more than 15% in 2 days

Next to these the general humane endpoints will be applied:

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

Indicate the likely incidence.

Drop in general condition or cachexia <2%
Significant ulceration is occurring 5-7%

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).

Mice not receiving injections 'mild'
Mice receiving injections of pre-labelled cells 'mild'
Mice under (long) anesthesia 'moderate'
Imaging sessions 'mild'
Induction of inflammation 'mild'

The cumulative discomfort for all the animals in this study has been set **from 'mild' (80% mice) and moderate (20% mice)**.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

The animals will be sacrificed when there is a need to collect the tissue for analysis or the end is reached. The animals will also be sacrificed when humane endpoints are reached.

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

**Appendix
Description animal procedures**

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Analyzing the fate of nanoparticles after in vivo administration. The nanoparticles will be non-targeted or targeted to various cells

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.

In this part we will study the biodistribution of the nanoparticles in vivo. This is essential for both cell tracking and ablation enhancement experiments. The same nanoparticles (developed for imaging) will be used, as in the rest of the project. The only modification will be functionalisation of the nanoparticle surface, for example through the addition of a targeting antibody. Targeted or non-targeted nanoparticles will be directly administered into the mouse via foot pad, intravenous or intranodal injections. In this part of the project we will use 3 tumor models: B16 melanoma, 9464D neuroblastoma and EL4 thymoma. The tumor cells will be injected subcutaneously.

Readout parameters in this experimental part will be:

- In vivo imaging is the main readout parameter here. Nanoparticles will be tracked in vivo using different imaging modalities (MRI, fluorescence, ultrasound, photoacoustics). The mice will be imaged at most 5 times within a two week period at specific time points. Imaging will be done in a continuous session where the mouse will remain under anesthesia, duration of max. 2h per session per mouse. Each mouse can be imaged with all of these techniques, so that lowers the amount of mice needed per experiment. What is more, all these imaging modalities are available within the same laboratory, so logistically doing imaging with several modalities is feasible.
- The in vivo results will be validated by conventional ex vivo analyses. To look at the in vivo uptake of nanoparticles, relevant organs/tissue will be excised then tested with flow cytometry and histology ex vivo. A mouse will be sacrificed at a specific time point and organs/tissues will be collected, after in vivo imaging. This is essential to validate the in vivo imaging data. Collecting data by techniques such as histology is necessarily terminal, and increases the numbers of mice required, but no alternatives are available.

For example, a typical protocol would be: A group of mice receives an intravenous injection of nanoparticles. The mice are then imaged at day 0, day 1, day 4 and day 8 using in vivo MRI and fluorescence imaging. Some mice from the group are sacrificed after imaging at days 1 and 4 for histological analyses of relevant tissues (such as the liver) for validation of the in vivo imaging data.

Since the nanoparticles are approved for clinical testing, we are confident that they will not prove toxic to the mice. Furthermore, the use of in vivo imaging allows use to reuse each mouse for more than one imaging session, although the sessions will be kept short (2 hours) and sufficiently spaced out (at least 24 hours, and preferably longer) and limited to a maximum of 5 per mouse. This is to reduce any side effects due to anesthesia (isoflurane). Some mice will need to be sacrificed at earlier time points, for validation of the imaging data through histology. Finally, because we are studying the immune system and its response to cancer therapy, we will be able to use only female mice to avoid sex-related differences in their immune systems.

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

Procedures nanoparticle transfer

Nanoparticles (PLGA-entrapped perfluorocarbon) will be injected via foot pad, intravenous or intranodal injections followed using multimodal imaging (MRI, ultrasound and photoacoustic imaging using high frequency scanner). The route of injection will be finalized based on the functionality of the injected cells (ie can the injected cells reach lymph nodes, and can these can detected via in vivo imaging).

Some mice will receive only particles, while other will receive cells labeled with particles. The free particles serve as important controls, so we can see if the cells are actively migrating.

Further, the mice will be imaged at most 5 times within a 14-day period. Imaging will be done in a continuous session where the mouse will remain under anesthesia, duration of max. 2h per session per mouse. Each mouse can be imaged with all of these techniques, so that lowers the amount of mice needed per experiment. What is more, all these imaging modalities are available within the same laboratory, so logistically doing imaging with several modalities is feasible.

The exact imaging schedule will be determined experimentally, although within a 14-day limit. For example, a mouse is injected with dendritic cells labeled with the nanoparticles in the foot pad, and then imaged on days 1, 3, 9 and 14 post-injection using MRI, fluorescence and ultrasound imaging. Because all the imaging scanners are located close to each other, the mouse can be imaged using all these modalities without waking up from anesthesia.

Here, we will also use tumor models in order to look whether the nanoparticles accumulate within the tumor. We will use 3 tumor models: B16 melanoma, 9464D neuroblastoma and EL4 thymoma. The tumor cells will be injected subcutaneously.

Procedures readout assays

Imaging techniques will be used to trace the injected nanoparticles, primarily through in vivo images. However, the in vivo data will need to be validated using an established technique, namely histology. Thus, at specific time points (such as days 1, 3, 9 and 14 post injection), animals will be sacrificed via cervical dislocation. Then organs (such as liver, spleen, lymph nodes and tumour) will be harvested from the mice, after which these tissues will be processed further in the lab for analysis via the mentioned platforms (FACS, histology, viability assay).

Anesthetics

The imaging and cell tracking sessions will involve isoflurane inhalation. Anesthesia is necessary to keep the mice immobilised during imaging. Mice will be monitored for breathing and/or heart rate, and temperature when anesthetics are used.

Some animals may need chlorophyll-free feed (readily available from standard suppliers) in order to reduce background from chlorophyll in the gut in the fluorescence images.

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

The number of mice needed to be able to reach statistical significance will be calculated for each individual experiment using a power analysis. For this we will use the validated software program G-power 3.0.8. The type of statistical test that will be performed is dependent on the nature of the data generated. For instance, comparison of more than two groups, a kaplan meier curve, or a correlation plot all require different statistics. The power that will be used in these tests will be 80%, as this is the lowest number that still gives reliable outcomes, while keeping the numbers of mice low. Alpha values will be kept at 0.05, while variances needed for these analyses will be estimated based on former experiments or data from literature. If needed (more groups are compared at same time) a bonferroni correction will be taken into account.

B. The animals

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

Species

For our in vivo experiments we will use mice. Studying the in vivo behavior nanoparticles encapsulating an imaging agents is not possible in 'lower' species. In literature, mice are commonly used to study the in vivo behavior of various polymeric particles. Additionally, the immune system of mice is recognized as sufficiently comparable to the human immune system (when primates are excluded). From an immunological point of view, almost all relevant components that are present in men are present in mice, too. In this part, we will use wild type mice.

Origin

We will obtain our mice from registered EU breeding companies, or from our own breeding facility.

Estimated numbers

The total number of animals in these experiments is 125 mice.

- 25 mice for pilot experiment
- 50 mice to study in vivo uptake of imaging agents
- 50 mice for in vivo tracking of nanoparticles and cells

Mouse number estimation:

-pilot experiment to set up tumour models and establish optimal time points for imaging = 25 mice

-in vivo biodistribution requires 2 types of particles (targeted and non-targeted), 4 groups of mice (3 tumor models and non-treated controls), 3 time points = 24 = 25 mice (rounded up); furthermore some targeted agents will be tested only in a few mice to determine their efficacy before moving on to a full experiment with several time points as in the previous case, thus this would be (4 agents, 3 time points, 2 mice per time point)= 24 mice= rounded up to 25; in total = 50 mice

-Especially promising nanoparticles from the previous experiments, will be further validated using standard histology or flow cytometry, which requires more mice per time points; therefore 3 groups of mice (2 targeted agents and non-targeted control), 3 time points with 5 mice per time point = 45 mice, rounded up to 50 mice

(rounding up is necessary, as some mice may not develop tumours)

Life stages

Our experiments will preferably be done in mice younger than 6 months. However, depending on the specific subquestion, sometimes older mice can be valuable too. This will ensure every mouse is well-used. Unless there is a specific explainable need for it, mice will not be allowed to grow older than one year.

Sex

Only female mice will be used to avoid differences in results due to gender-related differences in the immune system. We chose to use only female mice because (1) it is not possible to transfer cells between male and female mice due to the possibility of immune reactions, and (2) strong sex differences in immune reactions are known to occur. [1] Therefore, we chose to use only female mice.

[1] Kovats, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell. Immunol.* 294, 63–69 (2015).

Species wild type	Origin commercial supplier/own in house breedings	Maximum number of animals 125	Life stage all ages (except for embryonic)
----------------------	---	----------------------------------	---

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.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement.

A significant part of our research is being done with in vitro cultures using cell-lines and tissue or tissue-like phantoms. However, it is necessary to use animals for further experiments as the in vivo behavior of nanoparticles may differ from in vitro set up. At the moment, it is not possible to mimic this sufficiently in vitro, or with computer models (so without animals), or in 'lower' species.

Reduction.

Our experiments are designed with the minimal number of mice needed to answer the questions in our studies. The minimal group size needed to reach statistical significance will in the majority of cases be calculated using power analyses. In cases where this is not possible we base ourselves on the number of cells needed per experiment, divided by the number of cells that can be obtained per mouse. We strive to make optimal use of the material from each mouse by combining experiments wherever possible.

Refinement.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep the discomfort for the animals as low as possible. The procedures and models we use in this proposal are described in literature to give reliable data. In these models there are currently no methods available to reach further refinement. When opportunities with respect to refinement arise during the course of the project we strive to implement these wherever possible.

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

In addition to the items mentioned under 'refinement' the extra precautions that are taken to reduce pain/stress or other discomfort are:

- Mice will first be made acquainted with the handling by the researcher, before they enter the actual experiment.
- Animals from one group will be housed together as much as possible. Randomization will be done as early in the experiment as possible, and re-randomization will be prevented if the experimental setup allows this. This will prevent unnecessary disturbance of social structures.
- Frequent checking of the animals before and during the experiment will prevent unnecessary discomfort.
- Each mouse can be imaged with all of the imaging techniques within one imaging session, which means the mouse will be anesthetized only once per each imaging session

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Injection of nanoparticle-loaded cells may cause some discomfort. The injections of pre-labelled cells will be followed by imaging sessions, thus the use of anesthesia is needed (mainly to prevent motion during the imaging, not due to pain). The animals may experience some discomfort while recovering from anesthesia. The mice will be imaged at most 5 times within a two week period. Imaging will be done in a continuous session where the mouse will remain under anesthesia, duration of max. 2h per session per mouse. Each mouse can be imaged with all of these techniques, which means the mouse will be anesthetized only once per each imaging session. This can bring the times each mouse will experience a discomfort to a minimum. During long sessions (max. 2 hours) each animal will be closely monitored to prevent any unnecessary discomfort. To prevent sudden

drops in mouse body temperature, we will use special heating platforms (when possible). In a situation when we see too low heart beat rate or too low temperature, we will immediately stop the imaging session and help the mouse to recover from anesthesia by warming it up.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Anesthetics:

Injection of the pre-labelled cell suspension and imaging with various imaging modalities will be done under general anesthesia using isoflurane.

Analgesics:

The level of pain expected from the injections or imaging sessions will not need the use of analgesics . We will try to not use analgesics during the tumor growth as it may interfere with the final result of the experiments.

Experiment-related forms of discomfort:

- Injection of nanoparticles and cells or therapies
- injection of tumor cells
- tumor growth
- anesthesia

Explain why these effects may emerge.

The adverse effects may result from:

- Injection of nanoparticles and cells or therapies
- injection of tumor cells
- tumor growth
- anesthesia

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

Each mouse can be imaged with all of the techniques we are going to use, which means the mouse will be anesthetized only once per each imaging session. This can bring the times each mouse will experience a discomfort to a minimum. During long sessions (max. 2 hours) each animal will be closely monitored to prevent any unnecessary discomfort. To prevent sudden drops in mouse body temperature, we will use special heating

platforms (when possible). In a situation when we see too low heart beat rate or too low temperature, we will immediately stop the imaging session and help the mouse to recover from anesthesia by warming it up.

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.

The humane endpoints as present in the code of practice 'dierproeven in het kankeronderzoek' will be applied. Next to this, the following test specific humane endpoints will be used.

1. There is a significant drop in general condition or cachexia occurs. Loss of weight of more than 15% in 2 days
2. End of the experiment

Next to these the general humane endpoints will be applied:

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

We need the tumours to be large enough for the EPR effect to occur, and also for carrying out HIFU ablation. After that, we need to observe the treated mice (in relation to non-treated controls), to see how tumour growth is affected by the treatment. This is probably quite a slow process, thus the mice will need to be monitored for relatively long periods after treatment. Therefore, we currently cited the humane endpoint in this manner.

Indicate the likely incidence.

Drop in general condition or cachexia <2%

The total tumor mass reaches 2cm³: 50% (depending on the experimental setup up to 100% is possible)

Significant ulceration is occurring 5-7%

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).

Mice not receiving injections 'mild'
Mice receiving injections of pre-labelled cells 'mild'
Mice under anesthesia 'mild'
Imaging sessions 'mild' to 'moderate'
Induction of tumors 'mild'
Tumor growth 'moderate'

The cumulative discomfort for all animals will be 'mild' (50% mice), except those who will undergo longer imaging sessions and tumor growth. For those the cumulative discomfort will be 'moderate' (50% mice).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

The animals will be sacrificed when there is a need to collect the tissue for analysis or the end is reached. The animals will also be sacrificed when humane endpoints are reached.

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

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Improvement of tumor ablation therapies via the use of nanoparticles encapsulating an imaging agent and drugs

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.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

- Influx of DCs and related immune cells into tumor will be determined by flow cytometry (FACS), viability assay, and histology.

[REDACTED]

Since the nanoparticles are approved for clinical testing, we are confident that they will not prove toxic to the mice. Furthermore, the use of in vivo imaging allows use to reuse each mouse for more than one imaging session, although the sessions will be kept short (2 hours) and sufficiently spaced out (at least 24 hours, and preferably longer) and limited to a maximum of 5 per mouse. This is to reduce any side effects due to anesthesia (isoflurane). Some mice will need to be sacrificed at earlier time points, for validation of the imaging data through histology. Finally, because we are studying the immune system and its response to cancer therapy, we will be able to use only female mice to avoid sex-related differences in their immune systems.

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

Procedures tumor models

For the experiments in this part we will use tumor bearing mice. Tumor cells will be injected subcutaneously. In the typical model tumors will become palpable after approximately 10 days. From that day on, tumors will be checked frequently (2-3 times/week), and their growth will be measured using calipers, to ensure that humane endpoints will be detected in time.

Procedures treatments

First, nanoparticles will be injected intravenously in tumour-bearing mice. In case this does not result in sufficient concentration of nanoparticles in the tumour, intra-tumoural injections may be necessary. Once nanoparticles are present in a tumor, in situ tumor treatments will be done using ablation methods

[REDACTED] Each animal will remain under anesthesia for at most 2 hours, during which it will be closely monitored. Breathing frequency will be monitored and kept constant between 30 and 60 per minute. Body temperature will be measured with a rectal thermometer and maintained using a heated air flow device.

[REDACTED]

Procedures readout assays

Directly after the ablation treatment, the animals will undergo an imaging session. The lesions size will be measured using imaging techniques (MRI,

fluorescence and photoacoustic imaging) in order to establish whether the formation of lesion was enhanced by the presence of imaging agents. During the imaging session animals will remain under anesthesia using isoflurane.

Animals will be divided into groups depending on the experimental part.

To establish the influence of nanoparticles on the lesion size animals will be split into two groups where group 1 will be sacrificed right after the treatment and imaging session and organs will be harvested for FACS and histology; and group 2 will be kept for 48 hours. After 48 hours animals in group 2 will undergo an imaging session (MRI, fluorescence and photoacoustic imaging) with the use of isoflurane inhalation anesthesia. Each animal in this group will be imaged and the time of the session is expected to last max.2 hours. After imaging animals in group 2 will be sacrificed for tissues harvesting. These tissues will be further processed in the lab for analysis via the mentioned platforms.

and its influence on tumor development, mice will be imaged directly after the treatments (MRI, fluorescence and photoacoustic imaging) with the use of isoflurane inhalation anesthesia. Next, the animals will be closely monitored over the course of 4 weeks, when tumors will be measured with calipers. For this measurement animals will not have to be anesthetized. During those 4 weeks animals will be imaged using ultrasound and photoacoustic imaging at most 4 times, once a week.

Imaging sessions are necessary to measure the lesion size, tumor growth, and to detect any signal from nanoparticles encapsulating an imaging agent.

Anesthetics

In these experiments the exact growth location of the tumor needs to be secured, and therefore all tumor inoculations will be done under anesthesia. Same holds true for the in situ tumor treatments. This will involve one time isoflurane inhalation.

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

The number of mice needed to be able to reach statistical significance will be calculated for each individual experiment using a power analysis. For this we will use the validated software program G-power 3.0.8. The type of statistical test that will be performed is dependent on the nature of the data generated. For instance, comparison of more than two groups, a kaplan meier curve, or a correlation plot all require different statistics. The power that will be used in these tests will be 80%, as this is the lowest number that still gives reliable outcomes, while keeping the numbers of mice low. Alpha values will be kept at 0.05, while variances needed for these analyses will be estimated based on former experiments or data from literature. If needed (more groups are compared at same time) a bonferroni correction will be taken into account.

In special cases that have a strong pilot-character, and for which a-priori variances are difficult to estimate, the minimum number of mice that still allows simple forms of statistics will be used per group.

Former studies helped us in our choice in which tumor model to invest and in which not.

B. The animals

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

Species

For our in vivo experiments we will use mice. Studying the in vivo behavior and role of nanoparticles encapsulating an imaging agents is not possible in 'lower' species. In literature, mice are commonly used to study the in vivo behavior of various polymeric particles and ablation therapies. Additionally, the immune system of mice is recognized as sufficiently comparable to the human immune system (when primates are excluded). From an immunological point of view, almost all relevant components that are present in men are present in mice, too. In this part, we will mainly use wild type mice.

We will obtain our mice from registered EU breeding companies, or from our own breeding facility.

Estimated numbers

The number of animals needed for these experiments is 120 mice.

- 90 mice to study the influx of DCs and related immune cells into tumor
- 30 mice to study the release of the therapeutics from nanoparticles and their effect on tumor cells

Mouse number estimation:

-tumour-bearing mice [redacted] 6 groups of mice (3 tumor models with one group each that receive treatment and one group that do not receive treatment to act as controls), with 3 intensities of ablation treatment and 5 mice per group = 90 mice -a selected tumour-bearing model from the previous experiments will receive particles that also contain an antitumoral therapeutic agent; thus 3 groups of mice (no particles, particles without therapeutics, particles with therapeutics) and 10 mice per group (a large number is needed to allow sufficient mice for procedures such as histology and flow cytometric analyses of tumor growth)= 30 mice

Life stages

Our experiments will preferably be done in mice younger than 6 months. However, depending on the specific subquestion, sometimes older mice can be valuable too. This will ensure every mouse from our breeding is well-used. Unless there is a specific explainable need for it, mice will not be allowed to grow older than one year.

Sex

Only female mice will be used, as the immune system can differ between male and female mice. We chose to use only female mice because (1) it is not possible to transfer cells between male and female mice due to the possibility of immune reactions, and (2) strong sex differences in immune reactions are known to occur. [1] Therefore, we chose to use only female mice.

[1] Kovats, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell. Immunol.* 294, 63–69 (2015).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
wild type	commercial supplier/own in house breedings	120	all ages (except for embryonic)

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.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement.

A significant part of our research is being done with in vitro cultures using cell-lines and tissue or tissue-like phantoms. However, it is necessary to use animals for further experiments as the in vivo behavior of nanoparticles and their influence on tumor ablation may differ from in vitro set up. At the moment, it is not possible to mimic this sufficiently in vitro, or with computer models (so without animals), or in 'lower' species.

Reduction.

Our experiments are designed with the minimal number of mice needed to answer the questions in our studies. The minimal group size needed to reach statistical significance will in the majority of cases be calculated using power analyses. In cases where this is not possible we base ourselves on the number of cells needed per experiment, divided by the number of cells that can be obtained per mouse. We strive to make optimal use of the material from each mouse by combining experiments wherever possible.

Refinement.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep the discomfort for the animals as low as possible. The procedures and models we use in this proposal are described in literature to give reliable data. In these models there are currently no methods available to reach further refinement. When opportunities with respect to refinement arise during the course of the project we strive to implement these wherever possible.

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

In addition to the items mentioned under 'refinement' the extra precautions that are taken to reduce pain/stress or other discomfort are:

- Mice will first be made acquainted with the handling by the researcher, before they enter the actual experiment.
- Animals from one group will be housed together as much as possible. Randomization will be done as early in the experiment as possible, and re-randomization will be prevented if the experimental setup allows this. This will prevent unnecessary disturbance of social structures.
- Frequent checking of the animals before and during the experiment will prevent unnecessary discomfort

- Each mouse can be imaged with all of the imaging techniques within one imaging session, which means the mouse will be anesthetized only once for the ablation treatment and post ablation imaging session
- Tumor growth will be closely monitored to avoid overgrowth and to monitor any effects on the animals themselves
- Close monitoring of animals, by measuring body temperature and heart rate during the experiment

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

During the tumor growth and when tumor reaches the size needed for treatment (around 7 mm) it can be expected that there will be mild forms of discomfort associated with the growth of the tumor. Giving continuous pain relief is unnecessary with this level of pain, and moreover, this will significantly influence the immune system. Therefore, in general for this experimental part analgesics will not be used.

Exceptions are the injection of nanoparticles, tumor cells and the tumor treatments. Not all injections of tumor cells will need to be done under general anesthesia, but in some specific cases where precise subcutaneous localization is required, the use of anesthetics is vital.

We will monitor the mice closely for any adverse reactions to the ablation treatment, such as burns. However, these are extremely unlikely, as we will keep the energy intensity low to mimic that used in the clinic.

During long treatment and imaging sessions (max. 2 hours) each animal will be closely monitored to prevent any unnecessary discomfort. Breathing frequency will be monitored and kept constant between 30 and 60 per minute. Body temperature will be measured with a rectal thermometer and maintained using a heated air flow device. During the imaging sessions to prevent sudden drops in mouse body temperature, we will use special heating platforms (when possible). After the treatment animals will be recovered from anesthesia and frequently checked to monitor any adverse post-treatments effects, such as slower movement and signs of severe discomfort.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Anesthetics:

As the tumors need to be positioned at a very exact spot for in situ tumor ablation, injection of the nanoparticles or tumor cell suspension will be done under general anesthesia using isoflurane.

██████████ imaging will also be done under isoflurane inhalation to make sure an animal keeps still. The imaging (with the use of MRI, fluorescence and photoacoustic imaging) will be done directly after ██████████ and at most 2 more time over the course of a week. Each of this imaging modalities can used within one imaging session, which means the animals will have to be anesthetized only once per session. The imaging session will last at most 2 hours.

Analgesics:

It can be expected that there will be mild forms of discomfort associated with the growth of the tumor. Giving continuous pain relief is unnecessary with this level of pain, and moreover, this will significantly influence the immune system. With respect to the in situ tumor ablation treatments we have tried various anesthetics/analgesics in the past. In combination with the ablation the animals however appeared to cool down significantly and even died more often. Moreover, these compounds are known to influence the immune significantly, what further can influence the results of our studies. The current use of isoflurane leads to no increased mortality. The post-operative stress/pain is reduced to normal levels within one hour after treatment.

Experiment-related forms of discomfort:

- Growth of subcutaneous tumors.
- Discomfort as experienced ██████████
- Injection of nanoparticles and cells or therapies
- injection of tumor cells
- anesthesia

Explain why these effects may emerge.

Adverse effects may result from:

- Injection of nanoparticles and cells or therapies
 - injection of tumor cells
 - tumor growth
 - anesthesia (isoflurane)
- ██████████

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

Each mouse can be imaged with all of the techniques we are going to use, which means the mouse will be anesthetized only once per each imaging session. This can bring the times each mouse will experience a discomfort to a minimum. During long sessions (max. 2 hours) each animal will be closely monitored to prevent any unnecessary discomfort. To prevent sudden drops in mouse body temperature, we will use special heating platforms (when possible). In a situation when we see too low heart beat rate or too low temperature, we will immediately stop the imaging session and help the mouse to recover from anesthesia by warming it up.

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.

The humane endpoints as present in the code of practice 'dierproeven in het kankeronderzoek' will be applied. Next to this, the following test specific humane endpoints will be used.

1. There is a significant drop in general condition or cachexia occurs. Loss of weight of more than 15% in 2 days
2. The total tumor mass exceeds 2cm³.
3. Significant ulceration is occurring. Not all wounds/necrotic patches on the tumor are ulcerations. A photo guide for the most often used tumor models present at the CDL will be used to distinguish between the various situations

Next to these the general humane endpoints will be applied:

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

Indicate the likely incidence.

Drop in general condition or cachexia <2%

The total tumor mass reaches 2cm³: 50% (depending on the experimental setup up to 100% is possible)

Significant ulceration is occurring 5-7%

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).

Mice receiving injections of pre-labelled cells or nanoparticles 'mild'

Mice under anesthesia 'mild'

Imaging sessions 'mild'

Induction of tumors 'mild'

Tumor growth 'moderate'

Tumor treatment 'moderate'

The cumulative discomfort for animals will be 'mild' (30% mice) , except those who will undergo longer imaging sessions or in which tumor growth will be extended. For those the cumulative discomfort will be 'moderate' (70% mice).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

The animals will be sacrificed when there is a need to collect the tissue for analysis or the end is reached. The animals will also be sacrificed when humane endpoints are reached.

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0045
2. Titel van het project: Nanoparticle imaging agents for cancer therapy
3. Titel van de NTS: Toepassing van nanodeeltjes voor kankertherapie.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 22-12-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 10-01-2017 en 07-02-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 17-01-2017 tot 24-01-2017 en van 13-02-2017 tot 17-02-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 24-01-2017 en 17-02-2017
 - advies aan CCD: 02-03-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 17-01-2017
 - Datum antwoorden: 24-01-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-3.1: De nanodeeltjes worden al geproduceerd en gebruikt in een klinische trial. De commissie neemt aan dat hier proefdieronderzoek aan vooraf is gegaan. Wat is er al bekend over deze nanodeeltjes en hoe verhoudt het onderzoek in dit project zich tot de klinische trial? Wat is de meerwaarde van dit proefdieronderzoek?

Antwoord: The nanoparticles are in a clinical trial where therapeutic cells (dendritic cells) are labelled with the nanoparticles ex vivo, and the labelled cells are injected directly into a lymph node. Thus, no free particles are injected the label is never injected intravenously. This is excellent for a first trial. However, we need to move towards in vivo or in site labelling, where the particles are injected intravenously and are then taken up by specific cells.

Thus, experiments on biodistribution and also the ability of the particles to reach tumours need to be carried out, as described in this proposal.

Furthermore, here, we will also test the efficacy of these particles for tumour ablation, based on some promising preliminary in vitro data (figure in section 3.2). We have no in vivo data on this aspect of the particles, although it would be a very exciting and relevant clinical application. Such experiments also require more knowledge of the biodistribution.

-3.2: De haalbaarheid is nog niet voldoende toegelicht met referenties naar eigen werk.
Antwoord: The nanoparticles have been previously tested for the 19F MRI cell tracking,¹ thus it is known that there is a possibility to track the nanoparticles and labelled cells in vivo.

[REDACTED]

-3.4.1: Zijn er nog geen data over de biodistributie van deze nanodeeltjes? In experiment groep 2 is sprake van targeted nanodeeltjes. Zijn deze targeted voor tumoren of voor ontsteking? Waarom is het interessant om de biodistributie van nanoparticles te onderzoeken bij een lokale inflammatie? (zie ook de vraag over DAP1, A1)

Antwoord: We are interested in moving forward from ex vivo labelling of therapeutic cells, as in the current clinical trial, to in vivo labelling, where the label is specifically taken up by the target cells. This would allow us to skip laborious ex vivo cell culture steps, and would also greatly reduce cost and risk to the patient. For such experiments, we need data on the in vivo biodistribution after intravenous administration, and also when the nanoparticles are equipped with a targeting agent.

Finally, it is known that some tumours and regions of inflammation show an enhanced permeability and retention (EPR) effect,² where the poorly formed vasculature is "leaky" and allows accumulation of certain agents at the tumour or site of inflammation. Since our nanoparticles are small enough for this, we would like to study the biodistribution of the nanoparticles under these conditions. If successful, this would provide a technique to image tumours or localise inflammation, both of which would be very useful in the clinic.

-3.4.2: Zijn de no go momenten goed gedefinieerd? Wat gebeurt er als de biodistributie ongunstig blijkt, of als er geen effect is op tumorgroei? De onderzoekers hebben hier de berekening van de aantallen dieren toegevoegd. De commissie verzoekt hen deze hier weg te laten en toe te voegen aan de desbetreffende DAPs. Het lijkt alsof de dieren voor de pilot tweemaal worden geteld.

Antwoord: In this project we would like to detect and show the distribution of our nanoparticles, in particular we would like to see if they will accumulate in the tumor. We are not interested in studying whether the presence of nanoparticles affect tumor growth. Regarding the animal number calculations, those have been removed from PP and are now described in DAP.

Description of Animal Procedures:

De uitwerking van het doel van het onderzoek in de DAPS lijkt wat onzorgvuldig. De onderzoekers worden verzocht dit beter uit te werken. Het is voor de commissie lastig te volgen waarom men deze experimenten wil doen met deze aantallen dieren.

*DAP1

-A1: Waarom willen de onderzoekers het effect van ontsteking onderzoeken? Dit is onvoldoende duidelijk uit het project proposal.

Antwoord: The answer to this question is presented in section 3.4.1 of PP.

-A: Klopt het dat er geen tumorgroei zal plaatsvinden bij de dieren in dit onderdeel van de aanvraag? Zo ja, dan graag alle verwijzingen naar tumorgroei verwijderen. Zo nee, dan graag tumorgroei toevoegen op de plaatsen waar dit vermeld dient te worden.

Antwoord: The references to tumor growth have been removed from this section.

-B: Waarom is het belangrijk om vrouwelijke dieren te gebruiken voor dit onderzoek? De commissie meent dat de gegeven reden (bij A1, wordt hier gevraagd) ook gebruikt kan worden om het gebruik van mannelijke dieren te rechtvaardigen.

Antwoord: We chose to use only female mice because (1) it is not possible to transfer cells between male and female mice due to the possibility of immune reactions, and (2) strong sex differences in immune reactions are known to occur.³ Therefore, we chose to use only female mice.

-K: Het ongerief veroorzaakt door de plaatselijke ontsteking ontbreekt.

Antwoord: It's been corrected to mild.

-K: Het ongerief van langdurige narcose en het bijkomen daaruit is matig.

Antwoord: It's been corrected.

-K: Het cumulatief ongerief is nog niet beschreven. (geldt ook voor andere DAPs). Indien dit niet voor alle dieren hetzelfde is, graag aangeven welke mate van cumulatief ongerief voor welk deel van de dieren geldt.

Antwoord: The cumulative discomfort has been set to mild or moderate, depending on the DAP and assays.

*DAP2

-A1: Welke tumormodellen worden gebruikt, en hoe worden deze aangebracht? De beschrijving daarvan ontbreekt hier en bij A2.

Antwoord: We will use 3 tumor models: B16 melanoma, 9464D neuroblastoma and EL4 thymoma. The tumor cells will be injected subcutaneously.

-A2: Volgens het PP 3.4.2 wordt in dit onderdeel de biodistributie van de nanodeeltjes onderzocht, terwijl hier en bij B en H2 ook sprake is van cellen met nanodeeltjes die worden geïnjecteerd en gevolgd. Graag in overeenstemming brengen met elkaar.

Antwoord: Some mice will receive only particles, while other will receive cells labeled with particles. The free particles serve as important controls, so we can see if the cells are actively migrating.

-J: Waarom is het voor dit onderzoek nodig de tumoren zo groot te laten worden dat 50 tot 100% van de dieren hierdoor een humaan eindpunt zal bereiken?

[Redacted text block]

-K: het ongerief van tumorgroei is nog niet ingeschat.

Antwoord: It was corrected to moderate.

*DAP3

[REDACTED]

[REDACTED]

-K: Het ongerief van tumorgroei is matig wanneer de tumor max 2 cm³ kan worden.
Antwoord: It's been corrected.

Niet-technische samenvatting:

-3.1 Dit project draait niet om de ontwikkeling van nanodeeltjes, maar om uitbreiding van de toepasbaarheid van bestaande nanodeeltjes.

-3.1 In dit onderzoek zal [REDACTED] worden. Dit komt onvoldoende tot uiting in de NTS.

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord:

Above points have been addressed and the changes were applied in the NTS.

References

1. Srinivas, M. et al. Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using 19F MRI and optical imaging. *Biomaterials* 31, 7070–7 (2010).
2. Hill, T. K. & Mohs, A. M. Image-guided tumor surgery: Will there be a role for fluorescent nanoparticles? *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* (2015). doi:10.1002/wnan.1381
3. Kovats, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell. Immunol.* 294, 63–69 (2015).

- Datum: 13-02-2017
- Datum antwoorden: 17-02-2017

Project Proposal:

-3.4.2: De onderzoekers antwoorden dat zij niet geïnteresseerd zijn in het antitumor effect van de nanodeeltjes. Dat is volgens de DEC in tegenspraak met het feit dat in DAP3 onderzocht wordt hoe tumorablatie therapie effectiever kan worden gemaakt met behulp van de nanodeeltjes die een “imaging agent” en geneesmiddelen bevatten.

Antwoord: In this project we would like to detect and show the distribution of our nanoparticles, in particular we would like to see if they will accumulate in the tumor. The goal of the experiment 2 is to see whether the nanoparticles will reach the tumor site, while in experiment 3 we would like to study the influence of the presence of nanoparticles on tumor ablation.

Description of Animal Procedures:

*DAP1

-A: nog niet alle verwijzingen naar tumorgroei zijn verwijderd uit deze DAP (zie onderdeel I).

Antwoord: The references to tumor growth have been removed from the DAP1 (I).

-K: percentages dieren met licht of matig ongerief ontbreken (geldt voor alle DAPs).

Antwoord: The percentage of animals experiencing discomfort have been added in part K of all DAPs.

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: The NTS has been checked and adjusted if needed.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. De beantwoording van de vragen van de commissie is niet altijd even zorgvuldig. De commissie is echter van mening dat zij desondanks een ethische afweging kan maken.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4B uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. 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.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het ontwikkelen en verbeteren van nanodeeltjes voor het in

vivo imagen van cellulaire therapie en voor effectievere ablatietherapie (eventueel in combinatie met medicijnafgifte) in muismodellen voor kanker. Het uiteindelijke doel is het verbeteren van celtherapieën voor kanker (doordat de therapeutische cellen in beeld gebracht kunnen worden en de therapie kan worden bijgestuurd) en van tumor ablatie. In eerste instantie zal de biodistributie van (targeted) nanodeeltjes en DCs met nanodeeltjes worden onderzocht. Later worden ook effecten op tumor ablatie en de lokale afgifte van geneesmiddelen onderzocht. Celtherapie voor kanker wordt al in de kliniek toegepast, maar heeft nog niet altijd het verwachte effect. Onduidelijk is nog of de toegediende cellen daadwerkelijk aankomen op de goede locatie, of ze daar functioneren en hoe lang ze effectief blijven. Wanneer deze cellen in het lichaam in beeld gebracht kunnen worden (hetzij na in vitro labeling, hetzij na in vivo labeling) kan dit aanknopingspunten bieden voor het verbeteren van de therapie. Uit voorafgaande in vitro experimenten [REDACTED] er nanodeeltjes in het tumorweefsel aanwezig zijn. De aanvragers zullen de aanwezigheid van (targeted) nanodeeltjes in tumorweefsel vaststellen en onderzoeken of dit leidt tot effectievere vernietiging van tumorweefsel. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project een directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf 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. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun kwaliteit van leven. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige ziekten, zoals kanker, is van groot belang voor de samenleving.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat die toch op kunnen treden.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het

project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

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 huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de herhaalde anesthesie die nodig is voor het imagen van de dieren en door de onderhuids groeiende tumoren waarvan de groei gedurende langere tijd wordt gevolgd. De commissie is van mening dat het cumulatief ongerief voor de dieren hierdoor kan oplopen tot maximaal matig ongerief voor de dieren die een tumor dragen en/of herhaaldelijk en langdurig onder anesthesie gaan. Voor de overige dieren is de ongeriefcategorie licht.
12. De integriteit van dieren wordt in beperkte mate aangetast door de onderhuids groeiende tumoren en doordat een aantal muizen geschoren wordt om de fluorescentie van cellen in het lichaam te kunnen meten. Beide hebben invloed op hun uiterlijk en gedrag.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is ingeschat op basis van eerdere resultaten met deze onderhuids groeiende tumoren. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten. Die zijn in overeenstemming met wat in het kankeronderzoek gebruikelijk is.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderdelen van het project die in vitro bestudeerd kunnen worden (bijvoorbeeld met fantomen) zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk. Er vindt een humane trial plaats met DCs die gelabeld zijn met nanopartikels, maar een aantal onderzoeksvragen (zoals de histologische bevestiging van de biodistributie van de cellen en de biodistributie van losse nanopartikels) kan alleen bij proefdieren worden onderzocht.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte

van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Waar mogelijk worden experimenten gecombineerd om optimaal gebruik te kunnen maken van het beschikbare materiaal. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolggexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Muizen zijn de minst complexe vertebraten met een immuunsysteem dat vergelijkbaar is met dat van mensen. De muizen worden met meerdere technieken onder anesthesie geimaged zonder dat ze tussentijds bijkomen, zodat ze niet elke keer last hebben van het ontwaken uit anesthesie. De effectiviteit van de therapie wordt onderzocht met onderhuidse tumormodellen die minder ongerief voor de dieren veroorzaken dan orthotoop groeiende tumoren. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen vrouwelijke dieren gebruiken. Hiervoor is de volgende onderbouwing gegeven: Er worden alleen vrouwelijke muizen gebruikt omdat er grote verschillen in immuunreacties kunnen optreden tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Donormuizen voor de isolatie van DCs dienen van hetzelfde geslacht te zijn als de ontvangende muizen. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te

beperken.

Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Celtherapie voor kanker is een veelbelovende vorm van immuuntherapie. Een aantal kankerpatiënten wordt al behandeld met deze therapie, maar de behandeling is niet altijd voldoende effectief. Tumor ablatie is een weinig invasieve behandeling waarmee tumoren (gedeeltelijk) vernietigd kunnen worden, maar die in de praktijk nog weinig ingezet wordt vanwege een beperkte effectiviteit. De resultaten van dit project zullen bijdragen aan de ontwikkeling van effectievere celtherapie en effectievere tumor ablatie. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van effectievere celtherapie en tumor ablatie van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: ontwikkelen en verbeteren van nanodeeltjes voor het *in vivo* imageren van cellulaire therapie en voor effectievere ablatietherapie (eventueel in combinatie met medicijnafgifte) in muismodellen voor kanker. Het uiteindelijke doel daarvan is het verbeteren van celtherapieën voor kanker (doordat de therapeutische cellen in beeld gebracht kunnen worden) en van tumor ablatie. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

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 is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017897

Bijlagen

2

Datum 2 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 maart 2017. Het gaat om uw project "Nanoparticle imaging agents for cancer therapy". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002017897. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

2 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017897

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
2 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017897

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 29
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: ██████████
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Datum:
2 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017897

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantievoor Dierenwelzijn
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: 2 april 2017
Geplande einddatum: 1 april 2022
Titel project: Nanoparticle imaging agents for cancer therapy
Titel niet-technische samenvatting: Toepassing van nanodeeltjes voor kankertherapie
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.541,-
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:

Instantie voor dierenwelzijn

Plaats:

Nijmegen

Datum:

2 maart 2017

Datum:

2 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017897



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Groteplein 10
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN

[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
AVD103002017897

Bijlagen

2

Datum 2 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 maart 2017

Vervaldatum: 1 april 2017

Factuurnummer: 170897

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: [REDACTED]

projectnummer: 2016-0045 Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002017897	€ 1.541,00

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.

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 31 maart 2017 11:06
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD1030002017897: Aanvullende informatie

Geachte Instantie voor Dierenwelzijn,

Op 2 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Nanoparticle imaging agents for cancer therapy' met aanvraagnummer AVD1030002017897. Wij hebben nog een vraag over uw aanvraag. In deze e-mail leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

- U geeft aan alleen vrouwelijke dieren te gebruiken. Hoewel we er begrip voor hebben dat u het geslacht van donoren en acceptordieren wilt matchen, is de gebruikte argumentatie voor het gebruiken van alleen vrouwelijke dieren in het project eerder als niet voldoende beschouwd. Kunt u aangeven waarom het niet mogelijk is om, met behoud van de mogelijkheid donoren- en acceptordieren te matchen, toch beide geslachten te gebruiken. U wordt verzocht aan te geven of er voor de te gebruiken modellen en uitleesparameters bekend is of er geslacht specifieke verschillen zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

U heeft veertien dagen de tijd om de ontbrekende informatie aan te leveren. De CCD zou uw aanvraag echter graag in de eerstvolgende CCD vergadering bespreken. Wij vragen u daarom de informatie uiterlijk donderdag 6 april 2017 aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den
Haag
... T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail
adres)

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

AVD103002017897-(2016-0045-05-04-2017)

Our response is :

We thank the CCD for looking at our proposal and raising relevant questions. We were asked about why we chose to use only female mice in our experiments.

The main reason that we opted for only female mice is that we are studying inflammation and cancer, and these conditions are known to exhibit sexual dimorphisms, both in humans and in mice [see references 1-6 below]. This is a problem for us, as we are studying inflammation and related processes in our experiments. Importantly, our previous data (from the last 10 years almost) is entirely in female mice, and we are building on that work in this project.

Thus, including male mice would increase variability in our data, as well as increase complexity in planning the experiments, in terms of matching donors and recipients. This would lead to an overall increase in the numbers of mice required, and therefore we opted to use only female mice.

References:

1. Systemic Inflammation and sexual dimorphism: more than meets the eye. Crit Care Med 2007.
2. Sexual dimorphism in cancer. Nat Rev. Cancer 2016.
3. Sexual dimorphisms in leukocyte trafficking in a mouse peritonitis model. J. Leukol Biol. 2015.
4. Secual dimorphisms of adrenal steroids, sec hormones and immunological biomarkers and possible risk factors for developing rheumatoid arthrritis. Int. J. Endocrinol. 2015.
5. Sexual dimorphisms in the immune system of catechol-O-methyltransferase knockout mice. Immunology 2012.
6. Discovery of sexual dimorphisms in metabolic and genetic biomarkers. PLoS Genet 2011.

[REDACTED]

Radboud University Medical Center (RadboudUMC)

[REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN

**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

AVD103002017897

Bijlagen

1

Datum 20 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nanoparticle imaging agents for cancer therapy" met aanvraagnummer AVD103002017897. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 05 april 2017 heeft u uw aanvraag gewijzigd. Op 31 maart 2017 hebben wij u gevraagd het gebruik van alleen vrouwelijke dieren te onderbouwen. Wij kunnen ons vinden in uw toelichting.

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 "Nanoparticle imaging agents for cancer therapy" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 april 2017 tot en met 1 april 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 maart 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 nemen wij over; inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Er worden aanvullende algemene voorwaarden gesteld.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
20 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017897

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 april 2017 tot en met 1 april 2022, voor het project "Nanoparticle imaging agents for cancer therapy" met aanvraagnummer AVD103002017897, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Zie samenvatting

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

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 2 maart 2017, ontvangen op 2 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 05 april 2017

Aanvraagnummer:
AVD103002017897

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. In vivo tracking of cells pre-labelled with polymeric nanoparticles containing an imaging agent				
	Muizen (Mus musculus) /	150	20% Matig 80% Licht	
3.4.4.2. Analyzing the fate of nanoparticles after in vivo administration. The nanoparticles will be non-targeted or targeted to various cells.				
	Muizen (Mus musculus) /	125	50% Matig 50% Licht	
[REDACTED]				
	Muizen (Mus musculus) /	120	70% Matig 30% Licht	

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

Aanvraagnummer:
AVD103002017897

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:

AVD103002017897

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:

AVD103002017897

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.

09 MRT 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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in 32600
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	PD ALT / Intravacc
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	

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

Straat en huisnummer	Antonie van Leeuwenhoeklaan	9
Postbus	450	
Postcode en plaats	3720AL	Bilthoven
IBAN	NL74INGB0705003612	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	PD ALT	

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	Wetenschappelijk medewerker	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

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

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 _ 0 3 _ 2 0 1 7
- Einddatum 3 1 _ 1 2 _ 2 0 1 8
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Ontwikkeling van microneaalden als alternatief vaccin toedieningsvorm
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van microneaalden als alternatief vaccin toedieningsvorm
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC ALT
- Postadres Postbus 450, 3720 AL Bilthoven
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- 2 x bijlage "beschrijving dierproeven"

6 Ondertekening

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Bilthoven

Datum 07 - 03 - 2017

Handtekening [REDACTED]



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene

gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 32600
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Intravacc
- 1.3 Vul de titel van het project in. Ontwikkeling van micronaalden als alternatief vaccin toedieningsvorm

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.

Momenteel worden de meeste mensen gevaccineerd via de intramusculaire route, waarbij het vaccin met behulp van spuit en naald geïnjecteerd wordt in spierweefsel van arm of been. Hoewel deze methode van injecteren effectief is, en voor medisch personeel makkelijk uitvoerbaar is, kent het ook nadelen. Ten eerste kan een injectie met spuit en naald stress en ongemak veroorzaken bij de personen die gevaccineerd moeten worden. Dit is met name het geval bij kinderen en mensen met een fobie voor naalden. Uit een recent onderzoek onder Nederlandse ouders is gebleken dat het gebruik van spuit en naald een reden kan zijn om kinderen niet of minder vaak te laten vaccineren.

(Kaaijk et al.; Parents' attitude toward multiple vaccinations at a single visit with alternative delivery methods; Human Vaccines and Immunotherapeutics, 2014). Ten tweede levert het gebruik van naalden gevaarlijk scherp medisch afval op. Dit is met name in ontwikkelingslanden een probleem, omdat hier de afvoer van scherp medisch afval meestal niet of minder goed geregeld is, waardoor de kans op ongewenste prikincidenten hoog is. Daarnaast worden, om kosten te kunnen besparen, vaak meerdere personen met één en dezelfde spuit en naald gevaccineerd. Dit kan leiden tot een verhoogd risico op overdracht van besmettelijke ziekten. De Wereldgezondheidsorganisatie schat in dat jaarlijks meer dan twee miljoen mensen besmet worden met ziektes zoals HIV, hepatitis B en hepatitis C door onveilig handelen met spuit en naald afkomstig van vaccinaties (http://www.who.int/injection_safety/global-campaign/en/). Bovengenoemde nadelen dragen bij aan de vraag naar ontwikkeling van alternatieve toedieningsvormen die spuit en naald kunnen vervangen. Zo heeft de Nederlands overheid, ons instituut gevraagd mee te werken aan de ontwikkeling van alternatieve toedieningsvormen voor vaccins. Om dit te kunnen bewerkstelligen, werkt ons instituut samen met bedrijven, instituten en/of universiteiten die technische kennis hebben op het gebied van de (technische) ontwikkeling van alternatieve toedieningsvormen, zodat dit gecombineerd kan worden met de expertise van ons instituut op het gebied van vaccin ontwikkeling.

Omdat het onderzoeksgebied voor alternatieve toedieningsvorm heel divers is, heeft ons instituut er voor gekozen om zich vooralsnog te beperken tot onderzoek naar technologieën die gebaseerd zijn op micro naalden, die gebruikt kunnen worden voor intradermale vaccinatie.

Micronaalden zijn naalden met een lengte van minder dan 1 millimeter die gebruikt worden om vaccins of andere medicatie intradermaal (tussen de epidermis en de dermis) toe te dienen (van der Maaden et al.; Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery; Journal of Controlled Release, 2012). De penetratie van deze naalden is gering en pijnloos omdat deze beperkt blijft tot de epidermis en niet in contact komen met de in de dermis gelegen zenuwuiteinden, die voor de pijnbeleving zorgen. Tevens zorgt het kleine formaat van de micronaalden er voor dat de incidentie op prikaccidenten verkleind kan worden en er minder medisch afval gegenereerd wordt. Naast de praktische voordelen hebben micronaalden ook potentieel een immunologisch voordeel: voor sommige vaccins blijkt dat intradermale toediening meer immunogeen is dan intramusculaire toediening; hierdoor kan mogelijk een lagere dosis vaccin gebruikt worden, wat weer een positieve invloed kan hebben op de kostprijs van het vaccin. Verscheidende vaccins zijn reeds succesvol getest via een intradermale route, zoals vaccins tegen gele koorts, influenza, hepatitis B en rabies (Roukens et al.; Intradermal vaccination to protect against yellow fever and influenza; Current Topics in Microbiology and Immunology, 2012; Roukens et al.; Intradermal hepatitis B vaccination in non-responders after topical application of Imiquimod (Aldara); Vaccine, 2010; Roukens et al.; Reduced dose pre-exposure primary and booster intradermal rabies vaccination with a purified chick embryo cell vaccine (PCECV) is immunogenic and safe in adults; Vaccine, 2008). Echter geldt ook voor deze toepassing dat er gebruik gemaakt wordt van spuit en naald maar dan volgens de specifieke Mantoux techniek. Een techniek die als zeer pijnlijk wordt ervaren en waarvoor de toediening met behulp van micronaalden een pijnloos alternatief kan zijn.

Er bestaan verschillende micronaald concepten (van der Maaden et al.; Microneedle technologies for (trans) dermal drug and vaccine delivery; Journal of Controlled Release, 2012). Ons instituut heeft hiervan twee concepten geselecteerd die elk hun eigen specifieke voordelen hebben. Het micronaald project van ons instituut kent dan ook twee deelprojecten, met elk een andere externe samenwerkingspartner.

1) Het eerste deelproject omhelst de ontwikkeling van zogenaamde holle micronaalden. In feite zijn dit meerdere geminiaturiseerde normale metalen naalden van minder dan 1 mm lang, gerangschikt in een zogenaamde "micronaald-array", waarmee de vaccin vloeistof geïnjecteerd wordt. Deze manier van toediening heeft als voordeel dat bestaande vloeibare vaccins in principe ook gebruikt kunnen worden in het holle micronaalden systeem. Uitgebreide herformulering van het vaccin op basis van deze technologie is dan ook niet nodig. De injectie met deze holle micronaald-array zal worden uitgevoerd met een speciaal ontwikkelde applicator; het hele systeem wordt in deze aanvraag de "micronaald-applicator" genoemd. De micronaald-applicator wordt op de huid geplaatst waarna bij het indrukken van

een knop de microneald-array uit de applicator komt en het vaccin geïnjecteerd wordt. Na toediening wordt de microneald-array weer teruggetrokken in de applicator, waarna het opzet stuk met de microneald-array, veilig weggegooid kan worden. De applicator is zo ontwikkeld dat het pijnvrij de micronealden kan toediening; op basis van andere studies is de verwachting dat dit ook daadwerkelijk het geval is.

De microneald-applicator is specifiek ontwikkeld voor toepassing in de mens; bestaande vloeibare vaccins zouden in principe met deze applicator toegediend kunnen worden (zoals eerder aangegeven). Hierdoor kan deze microneald-applicator mogelijk snel op de markt gebracht worden. Het doel van dit deelproject is om aan te tonen of de microneald-applicator daadwerkelijk geschikt is om een vaccin toe te dienen. De ontwikkeling van de applicator staat hierin centraal, en niet zozeer een specifieke combinatie van een bepaald vaccin en de microneald-applicator. De technische ontwikkeling van de microneald-applicator wordt uitgevoerd door een bedrijf wat zich gespecialiseerd heeft in medische instrumenten; ons instituut onderzoekt de toepasbaarheid van de microneald-applicator voor vaccinatie.

2) In het tweede deelproject wordt er gewerkt aan de ontwikkeling van solide micronealden. Dit zijn micronealden gemaakt uit gedroogd vaccin gemengd met hulpstoffen, die samen de naalden in zijn geheel vormen. De naalden kunnen vervolgens aangebracht worden in de huid (door middel van een pleister; "patch"), waarna de naalden in de huid achterblijven. De naalden, inclusief vaccin, lossen langzaam op in de huid. In tegenstelling tot het eerder genoemde concept heeft deze methode nog een aantal extra voordelen: er is geen applicator nodig om de micronealden toe te dienen omdat de micronealden aangebracht kunnen worden door middel van een pleister. Verder zijn vaccins in gedroogde vorm vaak stabielere dan in vloeibare vorm; dit is ideaal voor gebruik in landen waar koeling (wat vaak een vereiste is voor vaccins) nog een probleem kan zijn, zoals in ontwikkelingslanden.

Voor deze technologie geldt dat de samenwerkende partij in preklinische studies heeft aangetoond dat de microneald technologie zoals ontwikkeld effectief is voor verschillende vaccines. (Pearson et al.; Induction of CD8(+) T cell responses and protective efficacy following microneedle-mediated delivery of a live adenovirus-vectored malaria vaccine; Vaccine, 2015; Vrdojlik et al. Induction of broad immunity by thermostabilised vaccines incorporated in dissolvable microneedles using novel fabrication methods; Journal of Controlled Release, 2016). Nieuw aan de samenwerking met ons instituut is dat de microneald technologie wordt toegepast voor poliovaccines. Het gebruik van poliovaccin is nog nooit eerder getest voor deze microneald technologie en er wordt hierbij onderscheid gemaakt tussen een formulering met 1 type poliovirus (monovalent) en een formulering met 3 typen poliovirussen (trivalent). De reden voor deze aanpak is dat het formuleren van een monovalent type 1 vaccin eenvoudiger is dan het formuleren van een poliovaccin met 3 verschillende types. Dit kan invloed hebben op de immunogeniciteit.

Uiteindelijk moet de microneald technologie voor een trivalent vaccin toepasbaar zijn omdat alleen dit poliovaccin volledige bescherming biedt in mensen.

Kort samengevat: Binnen het project wordt er gewerkt aan de ontwikkeling van alternatieve toedieningsvormen, gebaseerd op micronealden. In het geval van deelproject 1 gaat het om de ontwikkeling en verfijning van de toedieningstechniek; zodra dit gereed is, kan de microneald-applicator relatief snel getest worden in combinatie met vaccins die geschikt zijn voor intradermale toediening. Deelproject 2 omhelst juist de ontwikkeling van een specifieke combinatie van de micronealdpatch en een poliovaccin. Om solide micronealden te maken is een vaccin-formulering nodig die specifiek voor het poliovaccin is ontwikkeld. Deelproject 2 is dus een combinatie van vaccin- en microneald-ontwikkeling. In beide deelprojecten zijn proefdierexperimenten nodig om de micronealdconcepten verder te kunnen ontwikkelen.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het project is onderverdeeld in twee deelprojecten, met elk een afzonderlijke doelstelling.

Het doel van deelproject 1 is om te onderzoeken of de microneald-applicator in staat om een vaccin intradermaal toe te dienen. De microneald-applicator is op technisch niveau ook nog in ontwikkeling.

Samen met de kennis van ons instituut op gebied van vaccins en alternatieve toedieningsvormen achten wij de haalbaarheid van dit deelproject hoog.

Het doel van deelproject 2 is om een combinatie van solide microneaalden en een poliovaccin te ontwikkelen. De technische kennis over het maken van solide microneaaldpatches wordt gecombineerd met de uitgebreide vaccin formuleringservaring van ons instituut. Hierdoor achten wij de haalbaarheid van dit deelproject ook hoog.

3.3 Belang

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

De verwachting is dat dit project leidt tot twee nieuwe alternatieve toedieningsvormen voor vaccins, die beide vrijwel pijnloos een vaccin intradermaal kunnen toedienen. Het belang hiervan is dat: a) Het pijnloos toedienen de acceptatie voor vaccinatie kan bevorderen wat uiteindelijk zal leiden tot een hogere vaccinatiegraad. b) Intradermale toediening van vaccins kan leiden tot dose-sparing, waardoor er minder vaccin per toediening nodig is, dit zal leiden tot gereduceerde vaccin kosten en een verhoogde beschikbaarheid van vaccins. c) Daarnaast zijn deze toedieningsvormen goed toepasbaar voor gebruikt in vaccinatiecampagnes in ontwikkelingslanden waarbij het risico op prikincidenten aanzienlijk verlaagd worden en zo het overdragen van besmettelijke ziekten ingeperkt wordt.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Deelproject 1 (holle microneaald-applicator):

Om te bepalen of de microneaald-applicator geschikt is voor intradermale toediening van vaccins, zullen er meerdere studies worden uitgevoerd. Er zal door middel van een dierproef bepaald worden of vaccins die door de microneaald-applicator toegediend worden nog in staat zijn om een immuunrespons op te wekken. Als modelvaccin zal er een influenzavaccin worden gebruikt. In deze immunisatiestudie zal er een vergelijking worden gemaakt tussen influenzavaccin dat intradermaal is toegediend met de microneaald-applicator en influenzavaccin dat intramusculair is toegediend met spuit en naald.

Naast de dierproef worden de prikeigenschappen van de microneaalden ook getest op humane huidbiopten (afkomstig van bijv. buikwandcorrecties en na goedkeuring van de patiënt aan de hand van een getekend informed consent). De data van de dierproef en de humane huidstudie zal gebruikt worden voor de verdere ontwikkeling van de microneaald applicator. Uiteindelijk zal er een fase I klinische studie worden uitgevoerd in vrijwilligers waarin de veiligheid en acceptatie van de microneaald-applicator zal vergeleken worden met een intramusculaire injectie met naald en spuit en een met intradermale toediening volgens de Mantoux-methode. Voor de aanvraag van deze fase I klinische studie is het van belang dat we de microneaald-applicator met succes hebben getest in een diermodel. Zodra al deze onderzoeken met succes zijn afgerond, is het uiteindelijke doel om de microneaald-applicator met een specifiek vaccin te testen in een fase I/IIa klinische studie.

Deelproject 2 (solide microneaaldpatch):

Voor de solide microneaalden geldt dat de werking van het vaccin afhangt van de formulering die gebruikt wordt voor het maken van de microneaalden. Een optimale formulering kan geselecteerd worden op basis van een in vitro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hierbij wordt aangetoond of de conformatie van vaccin antigenen ("epitopen") na formuleren nog in tact zijn. Als modelvaccin zal er gebruik worden gemaakt van een geïnactiveerd polio vaccin. De selectie van een optimaal polio vaccin formulering zal plaatsvinden m.b.v. van een D-antigeen ELISA (Ten Have et al.; Development of a fast ELISA for quantifying polio D-antigen in in-process samples; Biologicals, 2012). Na selectie van de juiste formulering wordt deze verder getest in een dierstudie waarbij de werkzaamheid van het vaccin getest wordt. Hierbij wordt het intradermaal toedienen van de microneaaldjes vergeleken met een conventionele (spuit en naald) immunisatiemethode waarbij de inductie van antigeen specifieke immuun responsen de belangrijkste parameter is.

In deze studie wordt er gefocust op de ontwikkeling van een nieuwe toedieningsvorm voor poliovaccin door middel van solide microneaalden.

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

Deelproject 1: Voor de holle microneaalden zal er een immunogeniciteitsproef worden uitgevoerd in dieren. (Immunologische evaluatie van vaccin toegediend met holle microneaalden). De microneaald-applicator is ontwikkeld voor toepassing in de mens, en is daarom voor veel kleine proefdieren relatief (te) groot. Om deze reden is er voor een groter proefdier, de cavia, gekozen. Een ander belangrijke factor is dat de huid van cavia's in meerdere opzichten gelijk is aan mensenhuid, wat van belang kan zijn voor het prikken van de microneaalden.

Deelproject 2: Voor de solide microneaalden zal er een immunogeniciteitsproef worden uitgevoerd in ratten waarbij de dieren gevaccineerd worden door middel van een prime-boost strategie om zo de beoogde poliovirus specifieke immuun responsen te kunnen induceren (Van Steenis et al.; Potency testing of killed polio vaccine in rats; Developments in Biological Standardization, 1981). De methode om poliovaccins te testen op werkzaamheid is gestandaardiseerd; deze test wordt in ratten uitgevoerd. Om deze reden is er gekozen voor de rat als diersmodel om de microneaald-polio vaccin combinatie uit te kunnen testen.

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.

Deelproject 1: Voor de holle microneaalden zal eerst bepaald worden of de microneaald-applicator in staat is om vaccins daadwerkelijk intradermaal toe te dienen in proefdieren. Indien dit niet het geval is, zal de microneaald-applicator aangepast worden. Dit geldt als het go/no go moment voordat de immunisatiestudie zal worden uitgevoerd. Nadat deze proef succesvol is verlopen, zal er een immunisatiestudie uitgevoerd worden waarin er een vergelijking zal worden gemaakt tussen influenzavaccin dat intradermaal is toegediend met de microneaald-applicator en influenzavaccin dat intramusculair is toegediend met spuit en naald.

Deelproject 2: Voor de solide microneaalden zal op basis van een D-antigen ELISA een optimale formulering geselecteerd worden voor zowel een monovalent vaccin als een trivalent vaccin, dat uit respectievelijk 1 of 3 typen poliovirus bestaat. Het monovalente vaccin zal als eerste getest worden in een immunisatie studie in ratten. Hierbij wordt het toedienen van monovalent poliovaccin intradermaal door microneaalden vergeleken met het intramusculaire toediening van poliovaccin met spuit en naald. Indien blijkt dat de intradermaal toediening van het monovalent poliovaccin het gewenste immuun respons induceert zal de proef herhaald worden met het trivalent vaccin.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Immunologische evaluatie van een vaccin toegediend met holle microneaalden
2	Immunologische evaluatie van polio vaccin toegediend met een pleister (patch) van oplosbare solide microneaalden
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project Ontwikkeling van micronaalden als alternatief vaccin toedieningsvorm
- 1.2 Looptijd van het project 3 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) Alternatieve toedieningsvormen, micronaalden, vaccin

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
- 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 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- De meest gebruikte route om vaccins toe te dienen is in het spierweefsel (intramusculaire route). Hiervoor worden spuiten en naalden gebruikt. Het gebruik van naalden heeft echter enkele grote nadelen: 1) Het kan stress en ongemak veroorzaken bij de gevaccineerde persoon (met name in kinderen). Dit kan de gewilligheid en acceptatie van vaccinaties verkleinen. 2) Het levert gevaarlijk scherp medisch afval op, wat met name in ontwikkelingslanden kan leiden tot prikincidenten en bijkomend besmettingsgevaar met ziektes zoals hepatitis en HIV. Er wordt daarom veel onderzoek gedaan naar alternatieve toedieningsvormen, die deze nadelen niet hebben. Een groep van veelbelovende alternatieve toedieningsvormen die momenteel in ontwikkeling is, zijn de micronaalden. Micronaalden zijn naalden met een lengte van minder dan 1 millimeter die vaccin in of door de huid kunnen toedienen. Vaccinatie met micronaalden is pijnloos, doordat de naalden

minder diep in de huid prikken en daardoor geen zenuwuiteinden raken die de prikkels geven voor pijn. Tevens zorgt hun kleine formaat er voor dat de incidentie op prikaccidenten verkleind kan worden, en er minder medisch afval gegenereerd wordt. Naast de praktische voordelen hebben micronealden ook potentieel een immunologisch voordeel: voor sommige vaccins blijkt dat toediening in de huidlaag (intradermaal) potenter is dan toediening via spierweefsel (intramusculair), waardoor er een lagere dosis vaccin gebruikt kan worden.

Het huidige project is onderverdeeld in twee deelprojecten. In elk deelproject wordt een ander micronaald concept getest. In het eerste deelproject wordt er gekeken of holle micronealden met behulp van een applicator daadwerkelijk vaccin in de huid kunnen toedienen. In het tweede deelproject wordt een specifieke combinatie van een gedroogd vaccin gecombineerd met een micronaald, en vervolgens getest op effectiviteit.

- | | |
|---|---|
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | De verwachting is dat dit project leidt tot een nieuwe micronaald systeem die vrijwel pijnloos een vaccin intradermaal kan toedienen. Dit kan de acceptatie van vaccinatie bevorderen, waardoor er een hogere vaccinatiegraad bereikt kan worden. Tevens zouden deze micronaald vaccins gebruikt kunnen worden voor vaccinatiecampagnes in derdewereldlanden. |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Er zullen cavia's (90 dieren) en ratten (300 dieren) worden gebruikt. |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | Er wordt matig ongerief verwacht door de wijze van toediening van het vaccin. Tevens kan er ongerief ondervonden worden door individuele huisvesting en langdurige anesthesie. |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Voor de cavia's wordt een matig ongerief verwacht, en voor de ratten matig ongerief. |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | De dieren worden geëuthanaseerd aan het eind van de dierproef. Het bloed van de dieren is nodig om immunologische testen mee uit te voeren, om te kunnen controleren of vaccinatie met micronealden hetzelfde of een beter effect heeft als/dan met gewone naalden. |

4 Drie V's

- | | |
|---|---|
| 4.1 Vervanging
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije | In het project gebruiken we zoveel mogelijk diervrije methoden om de vaccins te testen. Zo wordt voorafgaand aan de dierstudie het hulpmiddel voor toediening van het vaccin (de applicator) getest op humane huid biopten. De werkzaamheid van het vaccin wordt echter bepaald door de immunologische respons die het kan opwekken. Het opwekken van een |
|---|---|

alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

immuunrespons is echter een complex proces, waar momenteel geen diervrije alternatieven voor zijn.

4.2 Vermindering

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

Voor de immunologische studies is het minimaal aantal dieren voor de experimenten bepaald met behulp van een biostatisticus.

4.3 Verfijning

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

In het project worden verschillende vaccins getest. Voor één van de micronaald concepten wordt er een applicator gebruikt om de micronaalden toe te dienen. Deze applicator is ontwikkeld voor toepassing in de mens, en is daarom voor veel kleine proefdieren relatief groot. Om deze reden is er voor een groter proefdier, de haarloze cavia, gekozen. Een ander belangrijke factor is dat de huid van haarloze cavia's in meerdere opzichten gelijk is aan mensenhuid, wat van belang kan zijn voor het prikken van de micronaalden.

Voor het tweede micronaald concept wordt poliovaccin gebruikt. De test om poliovaccins te testen op werkzaamheid is gestandaardiseerd; deze test wordt in ratten uitgevoerd. Daarom is er gekozen om voor deze micronaald-vaccin combinatie de rat te gebruiken als diermodel.

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

Voor de haarloze cavia's geldt: dat de dieren individueel gehuisvest worden om verwondingen aan de huid te voorkomen. Ook zal de ondergrond en de temperatuur van de leefomgeving aangepast worden.

Voor de ratten geldt dat deze in groepen gehuisvest worden. Tevens zal er standaard kooiverrijking worden toegepast.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 1 | Immunologische evaluatie van een vaccin toegediend met holle micronealden |
- 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 aan te tonen dat intradermale administratie van een vaccin met de microneaaldapplicator mogelijk is, wordt de microneaald-applicator eerst getest in een dierstudie. Als modelvaccin wordt een influenza vaccin gebruikt; influenza vaccins worden al succesvol in mensen via de intradermale route toegediend. Van dit vaccin is dus al bewezen dat het beschermende immuunresponsen na intradermale toediening kan induceren.

De holle micronealden zijn ontworpen om met een applicator toegediend te worden. Deze applicator vormt een integraal onderdeel met de holle micronealden.

De studie bestaat uit twee onderdelen; in het eerste onderdeel worden de biotechnici getraind in het gebruik van de microneaald-applicator op de dieren. Tevens wordt daar de optimale injectiediepte voor de proefdieren bepaald.

Het tweede onderdeel van de studie bestaat uit de immunisatiestudie.

Deel 1: Training en optimalisatie van microneaald-applicator

Er zullen eerst enkele oefenvaccinaties uitgevoerd worden om het gebruik van de microneaald applicator te trainen. Tevens moet de bloedafname bij cavia's getraind worden door de biotechnici. Door deze training willen wij het risico op fouten tijdens de vaccinatiestudie zo klein mogelijk maken.

Tevens zal er worden gekeken of de microneaald-applicator inderdaad correct intradermaal vaccineert in de dieren. Hiervoor zullen de injecties uitgevoerd worden met een kleurstof, waarna bepaald kan worden hoe diep is geïnjecteerd. De intradermale toediening is succesvol als er geen kleurstof wordt gevonden in subdermale weefsels.

Deel 2: Immunisatiestudie

In de dierstudie zullen vier verschillende experimentele groepen getest worden: 1) Influenza vaccin intradermaal geïnjecteerd met de holle micronealden; 2) influenza vaccin intradermaal geïnjecteerd met conventionele spuit en naald; 3) influenza vaccin intramusculair geïnjecteerd met conventionele spuit en naald en 4) zoutoplossing intradermaal geïnjecteerd met de holle micronealden.

Centraal in de studie staat de vergelijking tussen intradermale toediening via de holle micronealden en intradermale toediening met conventionele spuit en naald; verwacht wordt dat de holle micronealden gelijkwaardig zijn. Als positieve controle is de intramusculaire injectie geïncorporeerd; dit is de normale vaccin toedieningsroute in proefdieren. Als negatieve controle wordt er een zoutoplossing met de holle micronealden intradermaal toegediend; deze zouden geen immuunrespons moeten opwekken.

De primaire uitkomstparameters zijn influenza-specifieke antistoftiters in het serum. Er wordt verwacht dat het vaccin toegediend met de holle micronealden het even goed doet als de intradermale controlegroep met spuit en naald; eventuele verschillen tussen de groepen zullen met een one-way ANOVA worden aangetoond.

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 dieren zullen tijdens het experiment elk tweemaal worden gevaccineerd met de vaccins genoemd in voorgaande sectie. Er wordt twee keer gevaccineerd om te garanderen dat er meetbare immuunresponsen worden opgewerkt. Eerdere studies met influenzavaccins in cavia's laten zien dat één enkele vaccinatie soms niet immunogeen genoeg is (Bonificio et al.; Fabrication of cell culture-derived influenza vaccine dissolvable microstructures and evaluation of immunogenicity in guinea pigs; Vaccine, 2015). De vaccinaties zullen plaatsvinden op dag 0 en dag 21 onder verdoving. Deze tijdstippen zijn geselecteerd aan de hand van bestaande literatuur over influenza vaccins in cavia's (waaronder bovengenoemde referentie). Op dag 35 worden de dieren geëuthanaseerd. Op dagen 0, 14, 21 wordt er van elk dier een bloedafname gedaan. Op dag 35 worden de dieren verbleed. In het bloed van deze bloedafnames worden de influenza-specifiek antistoftiters bepaald.

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

Het aantal dieren is berekend met een poweranalyse, gebaseerd op het vergelijken van de logaritmes van antistoftiters van twee groepen door een eenzijdige t-toets. Hiermee is rekening gehouden met een significantieniveau van 0.05 en een gewenste power van 80%. De standaarddeviatie op de readout (log antistoftiters) wordt geschat op 10% (op basis van eerdere studies in de literatuur met cavia's geïmmuniseerd met influenzavaccins), en we willen een effect size van minimaal 15% aantonen. Hieruit volgt dat er ongeveer 10 dieren per groep benodigd zijn.

B. De dieren

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

In deze dierstudie zal gebruik gemaakt worden van haarloze cavia's (hairless Hartley guinea pigs) afkomstig uit geregistreerde proefdierfok in binnen- of buitenland. Door haarloze dieren te gebruiken is het makkelijker om met de holle micronealden intradermaal te injecteren; er hoeft niet geschoren te worden. Scheren kan leiden tot irritatie van de huid, wat de lokale immuunrespons in de huid kan beïnvloeden. Verder is er bewijs dat de huid van de haarloze cavia veel overeenkomsten heeft met humane huid, met name qua dikte en structuur (Sueki et al.; Hairless guinea pig skin: anatomical basis for studies of cutaneous biology; European Journal of Dermatology, 2000).

Er zullen enkel vrouwelijke dieren gebruikt worden van 7-8 weken oud (ongeveer 400 gr.); het geslacht kan invloed hebben op de immuunrespons, waardoor de variatie in de resultaten vergroot wordt. De poweranalyse voor de berekening van de groepsgrootte is gebaseerd op data met alleen vrouwelijke proefdieren. Een studie om de optimale groepsgrootte te bepalen voor 2 geslachten zal erg veel dieren kosten. Omdat dit een eenmalige proef is, en het totaal aantal dieren vrij beperkt is, willen wij ons beperken tot enkel vrouwelijke dieren.

Het benodigde aantal dieren voor deze proef wordt geschat op 90. Er zijn 10 dieren benodigd om de applicator voorafgaande aan de immunisatieproef te testen. Voor de immunisatieproef wordt het aantal benodigde dieren geschat op 40. Er worden nog eens 40 dieren begroot voor een tweede proef indien de eerste proef herhaald moet worden. Herhaling is wellicht nodig door onverwachte uitval van de dieren (door bijvoorbeeld een onverwachte infectie in de dieren tijdens de 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.

Het minimale aantal dieren om statistische verschillen aan te tonen is berekend door middel van een poweranalyse. Zo wordt voorkomen dat er (statistische) onbruikbare data uit de dierproef komt. Omdat de nieuwe immunisatiemethode het vaccin met hoge snelheid injecteert, is er gekozen om een groter diermodel (de cavia) te verkiezen boven een kleine dier zoals de muis.

De micronealdapplicator zal voor deze studie worden geoptimaliseerd voor intradermale toediening in dieren (zie proefopzet in deze bijlage). Tevens zullen dan de biotechnici getraind worden in het gebruik van microneald-applicator. Hierdoor wordt er voorkomen dat er onnodige fouten worden gemaakt tijdens het uitvoeren van deze proef, wat de kans op nadelige effecten op de dieren verkleint.

Naast deze dierstudie zal de microneald-applicator ook getest worden op humane huidbiopten. Hiermee worden de prikeigenschappen van de micronealden onderzocht en indien nodig geoptimaliseerd voor gebruik in de mens. Er kunnen echter geen immunologische responsen worden opgewekt in huidbiopten. Ook bestaat er geen ander in vitro model om de immunogeniciteit van het vaccin toegediend door de microneald-applicator te testen.

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 tijdens de vaccin toediening onder anesthesie gebracht om angst bij de dieren te verminderen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Niet van toepassing.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

De huid van de dieren kan makkelijk beschadigd worden omdat ze haarloos zijn. Ook kunnen de dieren zich moeilijker warm houden. Er wordt geen pijn verwacht van de injectie met de micronaald-applicator, omdat deze intradermaal (tussen de dermis en epidermis) injecteert, waar geen zenuwen liggen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Haarloosheid van de dieren.

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

Aangezien de dieren haarloos zijn, zal er een speciale ondergrond worden toegepast. Tevens zullen de dieren individueel gehuisvest worden om verwondingen aan de huid te voorkomen. Ook zal de temperatuur van hun leefomgeving aangepast worden.

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 cumulatief ongerief voor de dieren wordt geschat op matig. De dieren worden intradermaal of intramusculair geïnjecteerd, wat niet erg belastend is voor de dieren. Echter, doordat de dieren haarloos zijn kunnen ze ongerief ondervinden door de individuele huisvesting. We verwachten geen bijwerkingen van het influenza vaccin.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dieren worden aan het einde van de proef verbloed. Voor onze uitleesparameters is er zo veel mogelijk serum nodig voor verschillende analysetechnieken.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 32600
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Intravacc
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 2 | Immunologische evaluatie van het intradermaal toedienen van een Polio vaccin d.m.v. een pleister (patch) met oplosbare solide micro naaldjes |
- 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 aan te tonen dat intradermale immunisatie met behulp van een pleister (patch) mogelijk is, wordt een pleister geformuleerd met vaccin en getest in een dierstudie. De pleister bestaat uit oplosbare micronealdjes. Na aanbrengen van de pleister prikken de micronealdjes in de huid en lossen langzaam op. Het toedienen van micronealden is pijnloos, dit omdat ze klein in omvang zijn en niet diep genoeg in het weefsel kunnen prikken om zenuwuiteinden of bloedvaten te kunnen raken. Om de werkzaamheid van de pleister te onderzoeken wordt als modelvaccin een polio vaccin gebruikt. Polio vaccins worden al succesvol in mensen via de intradermale route toegediend. Van dit vaccin is dus al bewezen dat het beschermende immuun responsen na intradermale toediening kan induceren. De studie bestaat uit een immunisatie studie in ratten waarbij gekeken wordt of na toediening van de pleister neutraliserende antistoffen opgewekt kunnen worden tegen het polio virus. Om het concept te kunnen testen wordt er gekozen voor een formulering met monovalent (1 type poliovirus) en trivalent vaccin (3 typen poliovirus). Met het monovalent vaccin wordt onderzocht of het concept van intradermaal vaccineren met micronealden polio vaccin effectief is (proef 1). Indien dit het geval is zal de proef herhaald worden voor een trivalent vaccin waarbij de robuustheid van het concept getest wordt doordat er met meerdere serotypes poliovaccin tegelijkertijd geïmmuniseerd wordt. N.B. voor optimale bescherming tegen het poliovirus is een vaccinatie met een trivalent vaccin noodzakelijk.

In de dierstudie voor het Polio vaccin zullen vier verschillende experimentele groepen getest worden:

1) polio vaccin intradermaal toegediend op het oor van het dier met een pleister. Er worden 2 verschillende pleisters geformuleerd met monovalent en trivalent vaccin. Beiden patches worden getest in 3 verschillende vaccin concentraties.

2) polio vaccin intramusculair geïnjecteerd met de conventionele spuit en naald (monovalent en trivalent, 3 vaccin concentraties). Intramusculaire injecteren is 1 van de conventionele manieren van vaccineren met poliovaccins. Deze groep is toegevoegd om een directe vergelijking te kunnen maken met de intradermale toediening via de pleister.

3) intramusculair injectie van monovalent en trivalent vaccin opgelost uit de pleisters met de hoogste vaccin concentratie. Deze groep wordt geïncludeerd om aan te kunnen tonen dat het virus niet zijn werking heeft verloren na formuleren van de pleisters. De aanwezigheid van virus antigenen worden voorafgaand aan de dierstudies in vitro getest echter de werkzaamheid, het opwekken van neutraliserende antilichamen, kan alleen in vivo in een dierproef getest worden.

4) controle groep voor de intradermale toediening, vaccineren van dieren met mock geformuleerde pleister. Deze patch bestaat uit alle oplosbare bestanddelen waarvan de micronaaldjes gemaakt zijn met uitzondering van het vaccin. Omdat deze patches geen vaccin bevatten zal er ook geen immuunrespons opwekt worden.

Samengevat:

Proef	Groep	Route toediening	Wijze toediening	Poliovaccin	Vacin dosis		
					Hoog	Middel	Laag
1	1	Intradermaal	pleister met micronaalden	sIPV monovalent	10	10	10
	2	Intradermaal	pleister met micronaalden	formuleringsbuffer (1)	10		
	3	Intramusculair	opgeloste micronaalden	sIPV monovalent	10		
	4	Intramusculair	vloeibaar vaccin	sIPV monovalent	10	10	10
2	1	Intradermaal	pleister met micronaalden	sIPV trivalent	10	10	10
	2	Intradermaal	pleister met micronaalden	formuleringsbuffer (2)	10		
	3	Intramusculair	opgeloste micronaalden	sIPV trivalent	10		
	4	Intramusculair	vloeibaar vaccin	sIPV trivalent	10	10	10

Centraal in de studie staat de vergelijking tussen intradermale toediening (i.d.) via de pleister en de intramusculair toediening (i.m.) met conventionele spuit en naald; de vraag is of het gebruik van de pleister net zo effectief of beter zal zijn in het opwekken van neutraliserende antilichamen dan de conventionele methode met spuit en naald. De intramusculaire toediening is de normale vaccin toedieningsroute voor het testen van polio vaccin in proefdieren.

De primaire uitkomstparameters zijn polio-specifieke neutraliserende antistof titers in het serum, welke in de mens correleren met bescherming.

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 dieren zullen tijdens het experiment elk tweemaal gevaccineerd worden met de vaccins genoemd in voorgaande sectie. De vaccinaties zullen plaatsvinden op dag 0 en dag 21 onder verdoving. Op dagen 0, 21 en 28 wordt er van elk dier, onder verdoving een bloedafname gedaan en gewogen. Op dag 42 worden de dieren onder verdoving gewogen en geëuthanaseerd door verbloeding.

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

Primaire doelstelling is het aantonen van seroconversie na intradermale vaccinatie met poliovaccin waarbij de neutraliserende antilichaam titers hoger of tenminste gelijk zijn aan de titers geïnduceerd na intramusculaire vaccinatie. Titers groter dan een 8x serum verdunning worden beschouwd als positief. Uit eerdere experimenten is gebleken dat met een groepsgrootte van n=10 dieren (sample size calculator(<http://www.openepi.com>)) een medisch relevant verschil, namelijk een 'effect size' van 15%, aangetoond kan worden tussen de hoogste (gekozen op basis van 100% seroconversie) en laagste vaccinverdunding met 80% kans. Deze berekening betreft het vergelijken van twee groepen door een eenzijdige t-toets op significantie niveau van 5%.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia.

In deze dierstudie zal gebruik gemaakt worden van ratten afkomstig uit geregistreerde proefdierfok in binnen- of buitenland. Er zullen enkel vrouwelijke dieren gebruikt worden van 6-8 weken oud; De poweranalyse voor de berekening van de groeps grootte is gebaseerd op data met alleen vrouwelijke proefdieren. Een studie om de optimale groeps grootte te bepalen voor 2 geslachten zal erg veel dieren kosten. Omdat dit een eenmalige proef is, en het totaal aantal dieren vrij beperkt is, willen wij ons beperken tot enkel vrouwelijke dieren.

Geschatte aantallen:

Groep 1: 1 vaccin in 3 concentraties getest a 10 dieren per conditie is : $1 \times 3 \times 10 = 30$ dieren

Groep 2: 1 vaccin in 3 concentraties getest a 10 dieren per conditie is: $1 \times 3 \times 10 = 30$ dieren

Groep 3: 1 vaccin in 1 concentratie getest a 10 dieren per conditie is: $1 \times 10 = 10$ dieren

Groep 4: controle groep, 1 conditie a 10 dieren $1 \times 10 = 10$ dieren

Totaal aantal dieren per proef = **80**

Totaal aantal dieren per 2 proeven (vaccinatie met monovalent en trivalent vaccin) = **160** dieren

Er worden nog eens 160 dieren begroot voor herhaling van beiden proef. Dit aantal is behoudens eventuele aanpassingen in de vaccin concentraties en/of, aantal immunisaties en/of locatie van aanbrenge (flank i.p.v. oor) van de patches waardoor het experiment herhaald moet worden.

Totaal aantal dieren voor gehele aanvraag 2 experimenten x 160 dieren per experiment = **320** dieren

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.

Het minimale aantal dieren om statistische verschillen aan te kunnen tonen is berekend door middel van een poweranalyse en bevestigd in verschillende studies. Zo wordt voorkomen dat er (statistische) onbruikbare data uit de dierproef komt. De capaciteit van een polio vaccin om neutraliserende antilichamen te induceren kan getest worden in kippen, cavia's of ratten diermodel. Binnen ons instituut is ervaring met het ratten model en alle analyse methodes zijn gebaseerd op het analyseren van ratten sera.

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 tijdens alle vaccin toedieningen en bloedafnames onder anesthesie gebracht om zo de angst bij de dieren te verminderen.

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 micronaaldjes op de pleister zijn nog niet eerder geformuleerd geweest met het polio vaccin en zal in deze hoedanigheid voor het eerst in dieren getest worden.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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 cumulatief ongerief voor de dieren wordt geschat op matig, omdat de dieren herhaaldelijk onder narcose worden gebracht. De dieren worden intradermaal (pleister op de huid) of intramusculair geïnjecteerd, wat niet erg belastend is voor de dieren. We verwachten geen bijwerkingen van het polio vaccin.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dieren worden aan het einde van de proef verbloed. Voor onze uitleesparameters is er zo veel mogelijk serum nodig voor verschillende analysetechnieken.

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

14 juli 2016

Format DEC-advies

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

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
 2. Titel van het project: **Ontwikkeling van micronaalden als alternatieve toedieningsvorm voor vaccins**
 3. Titel van de NTS: **Ontwikkeling van micronaalden als alternatieve toedieningsvorm voor vaccins**
 4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - wijziging van vergunning met nummer
 5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC ALT**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **11-01-2017**
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: **19-01-2017 en 2-2-2017**
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van **24-01-2017 tot 30-01-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
 7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft de totstandkoming van deze projectaanvraag begeleid en stemt in met de versie waar de DEC uiteindelijk haar advies over uitbrengt.
- Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*
8. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum: **19-01-2017**
 - Plaats: **Bilthoven**
 - Aantal aanwezige DEC-leden: **7**
 - Aanwezige (namens) aanvrager: **Een medewerker van de verantwoordelijke onderzoeker.**
 - Gestelde vraag / vragen:

1. Zijn micronealden al ontwikkeld en worden ze hier getest of moeten ze nog (verder) ontwikkeld worden.
2. Gevraagd wordt of de micronealden echt pijnloos zijn.
3. Opgemerkt wordt dat zowel de toedieningsvormen met de holle als met de solide naalden uit meerdere kleine naaldjes bestaan. Gevraagd wordt of het hierdoor mogelijk is om in elk naaldje een ander type vaccin te doen, zodat meerdere vaccins tegelijk kunnen worden toegediend.
4. Gevraagd wordt of er iets bekend is over de immunogeniteit van influenza vaccins in haarloze cavia's.
5. Opgemerkt wordt dat in het project wordt aangegeven, dat deze cavia's dezelfde huidstructuur en dikte hebben als mensen. Gevraagd wordt of dit geldt voor alle huidtypen, m.n. omdat deze toedieningsvorm met micronealden vooral ook ontwikkeld wordt voor gebruik in ontwikkelingslanden.
6. Aangegeven wordt dat in de tekst staat dat als er iets fout gaat, de test over gedaan zal moeten worden. De DEC gaat ervan uit dat er dan eerst iets aangepast wordt en dat de IvD daarop toeziet, voordat de test herhaald wordt.
7. In de tekst in bijlage 1 staat niet duidelijk aangegeven waar welke groep voor dient. Dit roept de vraag op waarom groep 2 niet als positieve controle kan dienen en groep 3 niet kan vervallen.
8. M.b.t. bijlage 2 wordt gevraagd of de tweede immunisatie op dezelfde plek wordt gedaan als de eerste.
9. Ook wordt gevraagd wat het nut is van de tweede bloedafname.
10. Gevraagd wordt waarom er twee keer wordt geïmmuniseerd, terwijl mensen maar één keer worden geïmmuniseerd met een influenzavaccin.
11. Opgemerkt wordt dat door deze opzet er geen vergelijking mogelijk is tussen de antilichaamrespons met 1 immunisatie en met 2 immunisaties.
12. Opgemerkt wordt dat influenzavaccins altijd in fretten worden getest. Gevraagd wordt waarom er dan in dit projectvoorstel voor cavia's gekozen is.
13. In de beschrijving over het onderzoek met de solide naalden staat aangegeven, dat de solide naalden worden aangebracht door middel van een pleister en oplossen in de huid. Gevraagd wordt, hoe lang de pleister moet blijven zitten en waar de pleister bij de rat geplakt zal worden.
14. Opgemerkt wordt dat er verschillende keren naar studies verwezen wordt, maar dat de verwijzingen het niet mogelijk maken om de betreffende artikelen te vinden.
15. Gevraagd wordt waarom voor de testen met de solide naalden niet ook gekozen is voor de haarloze cavia als diersmodel. Waarom is het hier wel relevant dat de rat het gebruikelijke diersmodel is voor experimenten met poliovaccins?
16. Opgemerkt wordt dat bij normale werkzaamheidstesten voor poliovaccins 5 mannelijke en 5 vrouwelijke dieren worden gebruikt en dat voor dit onderzoek 10 vrouwelijke dieren worden gevraagd.
17. Opgemerkt wordt dat de WHO – op basis van studies - 1/5 humane dosis heeft goedgekeurd voor intradermale toediening. Is dit onderzoek nog wel nodig?
18. Opgemerkt wordt dat in de stukken niet duidelijk wordt aangegeven wat het precieze doel is van dit project.

Geconcludeerd wordt dat ook na de ter vergadering gegeven antwoorden er nog te veel zaken onduidelijk zijn om als DEC een advies te kunnen geven over de projectaanvraag. Dit is mede het gevolg van het feit dat de uiteindelijk verantwoordelijke onderzoeker zelf verhinderd was voor deze bijeenkomst. De DEC zou graag eerst een herschreven projectaanvraag zien. De vragen en opmerkingen van de DEC zullen zoveel mogelijk op schrift worden gesteld en aan de onderzoeker worden toegestuurd. De eindverantwoordelijke onderzoeker zal worden uitgenodigd om in de volgende DEC-bijeenkomst alsnog een nadere toelichting te geven op het project. Tot die tijd zal het projectvoorstel worden aangehouden.

- Het horen van de aanvrager heeft **wel** geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **24-01-2017**

- Gestelde vraag/vragen:

Project

1. In het project wordt dierexperimenteel onderzoek beschreven dat als doel heeft vaccintoediening met twee verschillende "devices" te onderzoeken. Uit de projectbeschrijving (en met name punt 3.4.3) wordt niet goed genoeg duidelijk waarom ze samen één project vormen. De onderdelen zouden ook onafhankelijk van elkaar uitgevoerd kunnen worden en vormen niet vanzelfsprekend één project. De DEC adviseert om duidelijk aan te geven wat het verband is tussen deze twee deelprojecten en waarom ze één project vormen.

2. De achtergrondinformatie die over de solide micronaalden opgenomen is in het project is vrij beperkt (Wat is de taak/rol van degene die de naalden produceert en wat is de rol/het belang van degene die ze uittest?). Graag helder formuleren wat achtergrond van deze aanpak is en hoe daaruit de doelstelling van dit project voortvloeit. Er is kennelijk al informatie over de ontwikkeling en toepassing van solide micronaalden. Wat is de stand van zaken en wat voegt dit onderzoek toe? Ook, als logische afsluiting van deze inleiding, graag aangeven wat dus de exacte doelstelling van dit project is. Gaat het hier over het verder ontwikkelen en verfijnen van de beide toedieningstechnieken? Of gaat het hier om het ontwikkelen, formuleren en testen van vaccins die geschikt zijn om met behulp van micronaalden te worden toegediend? Of is het een combinatie van beide?

3. Verder worden er verschillende verwijzingen gedaan naar wetenschappelijke literatuur, maar op basis van de aangeleverde gegevens is het niet mogelijk de artikelen terug te vinden.

4. De DEC vindt de projectaanvraag op veel punten tekstueel te kort schieten (zowel grammaticaal als inhoudelijk) en onduidelijk. De DEC wil dan ook adviseren om de aanvraag door een derde persoon te laten lezen en eventueel te laten herschrijven.

5. Graag de tekst onder 3.2 herschrijven. De DEC vindt de vermelding "De haalbaarheid van het project is hoog, omdat de micronaaldconcepten al in verre ontwikkeling zijn, zoals aangegeven in 3.1." vreemd. Immers, als al in verschillende studies aangetoond is dat het micronaaldenconcept werkt, dan is het overbodig om dat nogmaals te onderzoeken in dit project.

6. Graag de tekst onder 3.3 herschrijven. De DEC adviseert om hier het project te bekijken op een hoger niveau ("helicopterview"). Er worden een aantal argumenten door elkaar heen gebruikt. De tekst in de NTS is veel duidelijker en zou als uitgangspunt gebruikt kunnen worden.

7. Onder 3.4.1 wordt aangegeven, dat "de micronaalden ook getest worden in een ex vivo humaan huidmodel". Het is echter onduidelijk wat bedoeld wordt met ex vivo materiaal? Zijn dit huidbiopten of gekweekte huid? Indien het om huidbiopten gaat, is het verstandig de herkomst van het materiaal, en de toestemming voor het gebruik ervan te vermelden. Ook merkt de DEC op dat het van belang is na te gaan of het device geschikt is voor huid afkomstig van mensen met verschillende leeftijden en etnische achtergronden. In het project wordt immers beschreven dat deze devices mogelijk (en misschien zelf wel voornamelijk) in andere werelddelen toegepast zouden kunnen gaan worden.

8. Het is de DEC onduidelijk waarom het noodzakelijk is om zowel een monovalent- als een trivalent polio vaccin te onderzoeken voor deze proof-of-concept? Het onderzoeken van alleen een trivalent vaccin zou een flinke besparing van het aantal proefdieren opleveren.

Bijlage 1

9. Titel: Wordt "Immunologische evaluatie van een vaccin" bedoeld of van "vaccins"?
10. De argumentatie voor het gebruik van alleen vrouwen is onvoldoende. Graag aangeven waarom alleen vrouwelijke dieren geschikt zijn. Zou het gebruik van 2 geslachten leiden tot grotere groepen? Zijn er historische data om dat te onderbouwen? Indien er historische data zijn, graag duidelijk vermelden of een figuur opnemen.
11. In het algemeen worden fretten als model gebruikt voor influenzaonderzoek. Het is de DEC onvoldoende duidelijk waarom in dit project gekozen is voor cavia's als diemodel. Het argument dat de huid van de naakte cavia's goed vergelijkbaar is met die van de mens is voor de DEC niet doorslaggevend. Kennelijk is het voor u ook niet doorslaggevend, want in bijlage 2 gebruikt u geen cavia's maar ratten, omdat de rat de gebruikelijke diersoort is voor het testen van de immunogeniteit van poliovaccins. Is het niet mogelijk om het device op fretten te testen? In hoeverre is de cavia een goed en relevant model voor influenza onderzoek? Is er literatuur waarin dit beschreven wordt? Indien het device op fretten zou worden uitgetest kunnen de resultaten beter geïnterpreteerd worden tegen de achtergrond van het gebruikelijke influenzaonderzoek.
12. Het is onvoldoende duidelijk wat de toegevoegde waarde van het device is, dat in deze bijlage wordt onderzocht. Gaat een injectie met dit device daadwerkelijk niet gepaard met pijn? Uit welk onderzoek blijkt dat de acceptatie van dit device hoger ligt dan conventionele toedieningsvormen? Waarom kan dit device niet eerst getest worden in de mens (met fysiologisch zout) voordat overgegaan wordt tot proefdierkundig onderzoek met vaccins?
13. De DEC mist onder D / Vervanging de humane huidbiopten. Graag opnemen.
14. Onder onderdeel E. moet niet van toepassing ingevuld worden. Onder H adviseert de DEC om niet een specifieke techniek voor narcose op te nemen, maar het algemener te houden. Ook vraagt de DEC zich af of het noodzakelijk is de dieren onder narcose te brengen als ze alleen een injectie krijgen?

Bijlage 2

15. Zie opmerking 7.
16. Zoals eerder opgemerkt is het de DEC onduidelijk waarom gekozen is voor alleen vrouwelijke dieren. Ook zijn de verschillende groepen onduidelijk geformuleerd en is de niet duidelijk waarom gekozen is voor deze groepsgroottes. Er valt niet te verwachten dat de spreiding in resultaten als gevolg van een i.m. vaccinatie anders is dan in een conventionele potency bepaling en het is dan ook onduidelijk waarom voor deze groep niet gebruik kan worden gemaakt van 2 geslachten. Wordt verwacht dat de spreiding in de data als gevolg van vaccinatie met de solide micronaalden groter is? Graag ook aangeven waarom er hier gekozen is voor het testen van 3 concentraties van het vaccin i.p.v. 5 concentraties, zoals dat gebeurt in de conventionele potency bepaling. Ook adviseert de DEC om een biostatisticus te raadplegen.
17. Aangegeven is dat de pleister waar de solide micronaalden op zitten, vier uur moet blijven zitten om effectief te zijn. De DEC vraagt zich af of dit praktisch haalbaar is, immers de ratten zouden de pleister eraf kunnen krabben. Om dit te voorkomen, zouden de dieren langdurig onder anesthesie moeten blijven. Dit is echter niet wenselijk vanuit een dierenwelzijnsoogpunt. Een andere optie, waarmee ervaring is binnen het ARC, is de pleister op de rug aan te brengen en de dieren te verbinden. De mate van ongerief staat nu op licht, maar dient afhankelijk van de uiteindelijk gekozen methode mogelijk nog aangepast te worden.
18. De 3V's worden in beide bijlages onvoldoende beschreven. Graag alsnog doen. Hiervoor zou de tekst in de NTS als uitgangspunt gebruikt kunnen worden.

NTS

19. Punt 3.4. De DEC vraagt zich af of de negatieve gevolgen "van het vaccin" zijn of "door toediening van het vaccin". Zie formulering. Ook is de DEC van mening dat de individuele huisvesting en het mogelijk langdurig onder anesthesie houden van de dieren ook ongerief veroorzaakt.

20. Graag de veranderingen die in het projectvoorstel en de bijlages worden aangebracht ook in de NTS doorvoeren.

- Datum antwoord: **30-1-2017**

- Verstrek(t)e antwoord(en):

Ad 1. We hebben de twee onderdelen onderverdeeld in twee deelprojecten. Het is correct dat de twee concepten onderling van elkaar verschillen; ze vallen echter beide onder het micronaald onderzoek van Intravacc.

Ad 2. De achtergrondinformatie is aangevuld. Ook is er een afsluitende paragraaf geïncludeerd.

Ad 3. Dit is gecorrigeerd.

Ad 4. De tekst is gedeeltelijk herschreven. Hopelijk is de projectaanvraag nu duidelijker.

Ad 5. Dit deel is herschreven aan de hand van de opmerkingen.

Ad 6. Dit deel is herschreven met als basis de NTS tekst.

Ad 7. De tekst onder 3.4.1 is gedeeltelijk herschreven om een en ander te verduidelijken. De geschiktheid van de micronaaldapplicator voor verschillende etnische achtergronden en leeftijden moet inderdaad nog onderzocht worden. Tijdens de (technische) ontwikkeling van de applicator kan daar rekening mee worden gehouden. Vooralsnog zijn er bij andere micronaaldconcepten in de literatuur nog geen problemen gesignaleerd met incompatibiliteit met een specifieke etnische achtergrond/huidtype.

Ad 8. Het onderzoeken van een monovalent vaccin alleen is niet voldoende, omdat bescherming alleen beoogd wordt met een trivalent vaccin (zie ook de uitleg in projectvoorstel). Echter is er wel besloten dat het testen van micronaalden met monovalent en trivalent vaccin uitgevoerd gaat worden in 2 stappen. Mochten de resultaten van de micronaalden met monovalent vaccin niet de gewenste resultaten opleveren dan wordt het trivalent vaccin niet getest. Wel is het noodzakelijk dat voor beide studies een controle groep meegenomen wordt die alleen de formuleringsbuffer krijgt toegediend. Dit betekent dat voor de proeven 1 + 2 niet 150 maar 2x 80 dieren nodig zijn. Mocht het echter niet komen tot het testen van trivalent vaccin dan is hier sprake van een besparing van 80 dieren. Deze wijziging is doorgevoerd in bijlage 2.

Ad 9. Dit is aangepast.

Ad 10. Er zijn helaas geen historische data te vinden in de literatuur die immunogeniciteit van influenza vaccins vergelijkt tussen de 2 geslachten. Er bestaat dus een kans dat het includeren van 2 geslachten kan leiden tot een grote spreiding van de primaire uitkomstparameter, waardoor er geen significante verschillen meer gedetecteerd kunnen worden met de huidige groepsgrootte. De poweranalyse voor de berekening van het aantal dieren is ook gebaseerd op het gebruik van alleen vrouwelijke dieren. Om het verschil uit te sluiten, zou er eerst een directe vergelijking gemaakt moeten worden tussen de influenza-specifieke immuunrespons in mannelijke en vrouwelijke cavia's. Dit zal een aanzienlijk extra aantal dieren kosten bovenop de benodigde dieren voor de evaluatie van de micronaaldapplicator.

Ad 11. De DEC geeft aan dat in het algemeen fretten gebruikt worden voor influenzaonderzoek. Dit is inderdaad ten dele waar; de fret is hét diertype om de symptomen en transmissie van een influenza infectie te onderzoeken (Belsler et al.; The ferret as a model organism to study influenza A virus infection; Disease Models & Mechanisms, 2011). Het doel van deze proef is echter om te kijken of influenzavaccin dat intradermaal toegediend met behulp van de micronaaldapplicator nog steeds immunogeen is. Dit wordt uitgelezen door middel

van influenza-specifieke antilichamen in het bloed. Hiervoor is geen infectiestudie nodig. Hiervoor kunnen dus ook andere diermodellen gebruikt worden, zoals muizen en cavia's. Er zijn vele studies in de literatuur te vinden die muizen of cavia's gebruiken voor de ontwikkeling van influenzavaccins; cavia's zijn zelfs geschikt gebleken om infectiestudies mee te doen (Lowen et al.; The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses; PNAS, 2006). Fretten zijn dus voor ons studiedoel niet automatisch het beste diermodel.

De keuze om cavia's te gebruiken in plaats van bijvoorbeeld muizen rust op meerdere factoren. Ten eerste moet het diermodel groot genoeg zijn op de microneaaldarray (ongeveer 1 cm²) te plaatsen. Bij muizen zal dit aanzienlijk moeilijker zijn dan cavia's. Ten tweede bestaan er, zoals aangegeven, naakte cavia's, die een huidstructuur hebben die gelijkend is aan de mens (Sueki et al.; Hairless guinea pig skin: anatomical basis for studies of cutaneous biology; European Journal of Dermatology, 2000). Dit maakt ze zeer geschikt voor het testen van de microneaaldapplicator, en is dus doorslaggevend voor deze studie. De vergelijking met de bijlage 2 is onterecht; cavia's zijn voor poliovaccins niet het geschikte diermodel (Wilton et al.; Methods for the Quality Control of Inactivated Poliovirus Vaccines; Methods Molecular Biology, 2016). Alhoewel het mogelijk is om polio-specifieke antistoftiters op te wekken in cavia's, is de test niet gevoelig genoeg en correleert de antistofdata niet met de humane immuunrespons. De rat is daarentegen wel een goede predictor voor de humane immuunrespons. De redenatie is dus dat alhoewel de cavia een beter diermodel is voor micronealden in het algemeen (zelfde huiddikte als mens), dit niet toepasbaar is voor poliovaccins door de beperkingen in analytiek.

Ad 12. Deze vragen worden beantwoord in het herschreven deel van de projectomschrijving.

Ad 13. De huidbiopten zijn opgenomen onder dit punt.

Ad 14. Onderdeel E is aangepast.

We zullen geen specifieke narcose noemen. De toediening met de microneaaldapplicator vereist dat het huidoppervlak tijdens de injectie niet beweegt. Wij verwachten dat anesthesie hiervoor nodig is.

Ad 15. De technologie voor solide micronealden is nog in een vroeg stadium van ontwikkeling waarbij de samenwerkingspartner in eerste instantie gebruik heeft gemaakt van varkenshuid Vrdojak et al., Journal of Controlled Release, 2016). Dit heeft als voordeel dat het relatief makkelijk te verkrijgen is en de structuur van varkenshuid veel verwantschap vertoont met de humane huid (Summerfield et al., Molecular Immunology 2015) De opmerking m.b.t het gebruik van huidbiopten van mensen met verschillende etnische achtergronden en leeftijden zal in acht genomen worden zodra het testen van huidbiopten aan de orde is.

Ad 16. De omschrijving voor de keuze van de verschillende groepen wordt in bijlage 2 aangepast. De berekening voor het aantal dieren op basis van poweranalyse is beoordeeld door een statisticus. De dierproef betreft een immunogeniciteitsstudie waarbij een vergelijking gemaakt wordt tussen het intradermaal en intramusculair vaccineren van dieren met het poliovaccin. Hierbij is het toedienen van 3 concentraties met toepassing van een Anova als statistische toets voldoende. De conventionele potency bepaling daarentegen heeft als doel de werkzaamheid aan te tonen van een polio vaccin na inactivatie. Het betreft hier een ander onderzoeksdoel namelijk het vrijgeven van een vaccin voor humane toepassing waarbij de opzet van de methode meerdere verdunningen behoeft. M.a.w in dit project gaat het om een vergelijking tussen twee vaccinatie routes en niet om mate van werkzaamheid van het poliovaccin en dus kunnen we met 3 verdunningen voldoende informatie uit te proef halen. Er is nauwelijks data beschikbaar in de literatuur, waarbij onderzoek gedaan is naar het effect van geslachtsverschillen tussen mannelijke en vrouwelijke ratten en de inductie van immuunresponsen na poliovaccinatie. Het artikel van Shirato et. Vaccine 2014 suggereert dat er mogelijk een verschil bestaat tussen geslachten m.b.t. de inductie van neutraliserende antilichamen na poliovaccinatie.

Echter zijn de diergroepen klein waardoor er geen grondige conclusies getrokken kunnen worden. In conclusie, er bestaat een risico dat het includeren van 2 geslachten kan leiden tot een grote spreiding van de primaire uitkomstparameter, waardoor er geen significante verschillen meer gedetecteerd kunnen worden met de huidige groepsgrootte. De poweranalyse voor de berekening van het aantal dieren is ook gebaseerd op het gebruik van alleen vrouwelijke dieren. Om het verschil uit te kunnen sluiten, zou er eerst een directe vergelijking gemaakt moeten worden tussen de polio-specifieke immuunrespons in mannelijke en vrouwelijke ratten. Dit zal het aantal extra dieren dat nodig is voor de evaluatie van het concept voor de solide micronaalden concept aanzienlijk verhogen.

Ad 17. worden.

Op basis van deze opmerking is er overleg geweest met de samenwerkende partij. Deze adviseert de pleister op het oor toe te passen omdat dit vooralsnog de beste methode is om de pleisters met micronaalden te testen. Het hoofd wordt verbonden om zo de pleister overnacht te kunnen laten zitten. Zijn ervaring is dat dit nodig is om vooralsnog een maximaal beoogd resultaat te krijgen.

Ad 18. De 3V's zijn aangepast.

Ad 19. Dit is aangepast.

Ad 20. De NTS is hierop aangepast.

- De antwoorden hebben **wel/niet** geleid tot aanpassing van de aanvraag

8b. 2^{de} maal horen van aanvrager

- Datum: **02-02-2017**
- Plaats: **Bilthoven**
- Aantal aanwezige DEC-leden: **3***
- Aanwezige (namens) aanvrager: **De verantwoordelijke onderzoeker en een medewerker**
- Gestelde vraag / vragen:

De schriftelijk gestelde vragen en de aangepaste documenten en schriftelijke antwoorden op de vragen van de DEC worden met de onderzoekers doorgenomen. De nog overgebleven onduidelijkheden worden besproken en verder opgehelderd. Hieronder wordt dat weergegeven.

 1. De DEC merkt op dat het om 2 aparte deelprojecten gaat met een gezamenlijke paraplu. De DEC ziet de samenhang meer in het feit dat het in beide gevallen om intradermale toediening gaat met als eerste stap de ontwikkeling van het device en als tweede stap het testen van het vaccin. De onderzoeker beaamt dit.
 2. Nog onduidelijk is waarom een monovalent en een trivalent vaccin getest wordt. Onderzoeker geeft aan dat een monovalent vaccin beter stabiel te houden is en dus geschikter voor een proof-of-principle. Het trivalente vaccin is nodig i.v.m. de productontwikkeling.
 3. Gevraagd wordt waarom er een groep is opgenomen, waarin de solide micronaalden in opgeloste vorm intramusculair worden toegediend. Onderzoeker geeft aan dat als geen immuunrespons wordt gezien, men wil weten of het aan de pleister (dus de toedieningsvorm) ligt of aan het vaccin dat in de micronaalden is verwerkt.
 4. Er wordt toelichting gevraagd op de keuze voor het geslacht. Onderzoeker geeft aan dat in de literatuur alleen vrouwelijke dieren worden gebruikt. Om te kijken of het ook in twee geslachten kan, zou eerst een pilot gedaan moeten worden en omdat het om een eenmalig experiment gaat, loont dat niet. Dit zou slechts meer dieren kosten.
 5. Gevraagd wordt of het noodzakelijk is dat de dieren narcose krijgen voor het toedienen van het device. Staat wel vast dat de dieren niet rustig genoeg zullen zijn? Onderzoeker geeft aan deze vraag meegenomen kan worden in de training, maar dat het ook gedaan is, omdat de dieren toch al onder anesthesie gaan voor de bloedafname.

6. Opgemerkt wordt dat het verwarrend is dat onder 3.4 gesproken wordt over "project", terwijl daar het grote project wordt bedoeld waar dit project onderdeel van is. Wordt aangepast.

7. Waarom is er een dierproef noodzakelijk? Kan beter omschreven worden. De kans dat een fase 1 klinische studie wordt geaccepteerd, is veel groter als er eerst een dierstudie is gedaan waarin de haalbaarheid van het concept is aangetoond.

8. Aangegeven staat dat het hoofd van het dier verbonden zal worden. Is dat een gangbare methode en geeft dit meer ongerief? Kan de IvD hierop toezien? Onderzoeker geeft aan dit getoetst is en dat het vaker op deze manier wordt gedaan. Er komt iemand met ervaring om het te demonstreren en er kan eerst op dode dieren worden geoefend.

9. Er worden extra dieren gevraagd voor eventuele herhaling. Wat kan de reden zijn om het experiment te herhalen? Deze graag opnemen in de tekst. De onderzoeker denkt aan onvoorspelbare redenen, bijvoorbeeld een virus in de dierfaciliteit of de microbiologische status die achteraf niet goed blijkt te zijn.

9b. N.a.v. de 2^{de} hoor-sessie wordt afgesproken dat de onderzoeker de documenten aanscherpt aan de hand van bovengenoemde vragen. De DEC beschikt over voldoende informatie om een ethische afweging te maken.

*Het aangepaste projectvoorstel en het concept DEC-advies zijn op 1 maart 2017 schriftelijk aan de DEC-leden voorgelegd met de mededeling dat tijdens de laatste DEC-vergadering onvoldoende quorum was en het verzoek om zowel de documenten als het advies kritisch te bekijken.

Op 6 maart 2017 hebben 4 DEC-leden schriftelijk aangegeven in te kunnen stemmen met de aanpassingen in het projectvoorstel en het DEC-advies.

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 is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een helder omschreven doelstelling en het is duidelijk hoe de verschillende onderdelen binnen het project met elkaar samenhangen; in beide onderdelen wordt gestreefd naar de ontwikkeling van intradermale toedieningsmethoden voor vaccins die een aantal duidelijke, gemeenschappelijk voordelen ten opzicht van bestaande met naald en spuit toe te dienen vaccins. Het is duidelijk hoe deze onderdelen van het project passen binnen de doelstelling van het

project. De opzet komt goed overeen met voorbeeld 4B uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan.

2. Voor zover de DEC-ALT weet is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proeven beschreven in dit projectvoorstel in de weg zou kunnen staan.
3. De in het projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) (Translationeel of toegepast onderzoek) sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het ontwikkelen van intradermale toedieningsmethoden voor vaccins, waarbij gebruikt gemaakt wordt van micronaalden. Vaccinatie gebeurt normaal gesproken door middel van intramusculaire of subcutane injectie van een vloeibaar vaccin met een naald. De laatste jaren is de acceptatie van vaccinaties verminderd, mede omdat deze conventionele manier van toedienen pijnlijk kan zijn. Daarnaast levert deze conventionele methode scherp medisch afval op, wat met name in ontwikkelingslanden de kans op ongewenste prikincidenten met zich meebrengt en de kans op verspreiding van infectieziekten verhoogt. Met het ontwikkelen van alternatieve intradermale toedieningsmethoden voor vaccins wordt getracht een bijdrage te leveren aan de veiligheid en acceptatie van vaccinatie. Bijkomend voordeel van intradermale vaccinaties zou daarnaast kunnen zijn dat er een sterkere reactie van het immuunsysteem wordt opgewekt, waardoor de vaccinatie effectiever is en/of met een lagere dosis kan worden volstaan ("dose sparing"). Uiteindelijk dragen een bredere acceptatie van vaccinaties, minder scherp afval en "dose sparing" alle bij aan het waarborgen en bevorderen van de volksgezondheid. De DEC is van mening dat er een heldere relatie is tussen het directe en uiteindelijke doel en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden binnen dit onderzoek zijn de proefdieren, de bevolking, de onderzoekers en de bedrijven die intradermale toedieningsmethoden op basis van micronaalden ontwikkelen. De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en de dieren zullen ongerief ondervinden als gevolg van de vaccinaties. Mogelijk ondervinden de haarloze cavia's ongerief van hun kaalheid doordat ze sneller afkoelen of verwondingen oplopen. Na verloop van tijd zullen de dieren worden gedood voor het verkrijgen van bloed voor verder onderzoek. Voor de onderzoekers is het van belang kennis te vergaren en van economisch belang om samen te werken met de ontwikkelaar van de intradermale toedieningsmethoden. Voor het bedrijf dat deze methoden ontwikkelt is het van economische belang om de methoden verder te ontwikkelen en zo de implementatie van deze methoden te bevorderen. Wetenschappelijk aanzien en economische voordelen mogen door de onderzoekers en bedrijven zelf van belang geacht worden, maar voor de DEC legt dit bij de afweging over de ethische toelaatbaarheid van deze experimenten geen gewicht in de schaal. Voor de bevolking is het van belang dat er pijnloze en veilige vaccintoedieningsmethoden beschikbaar komen. Dit verhoogt de acceptatie (en daarmee de vaccinatiegraad) en maakt vaccinatie effectiever en veiliger. Uiteindelijk draagt dit bij aan het verminderen of zelfs uitroeien van infectieziekten.
6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van dit instituut en de betrokkenen bedrijven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvragers hebben jarenlange ervaring met het ontwikkelen en formuleren van vaccins, zoals blijkt uit de publicaties van dit instituut. De betrokken bedrijven hebben de toedieningsmethoden ontwikkeld en hebben ervaring met deze methoden in andere onderzoeksvelden. De DEC is dan ook van mening dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende is om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van de dierproeven.
8. De doelstelling van het project is helder uiteengezet en de voorgestelde experimenten sluiten hier goed bij aan. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet en dat jarenlange ervaring voldoende garandeert dat deze experimentele aanpak zal leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De aanvragers hebben het cumulatief ongerief voor zowel de haarloze cavia's als de ratten geschat op matig. Het ongerief dat de cavia's ondervinden wordt veroorzaakt door de intradermale of intramusculair injectie en de noodzaak tot individuele huisvesting. De ratten ondervinden ongerief van de intradermale (pleister op de huid) of intramusculaire injectie. De ratten die het poliovaccin toegediend krijgen middels een pleister moeten verbonden worden om ervoor te zorgen dat de pleister blijft zitten. Het verbinden zal ongerief met zich meebrengen. Ook is het nodig de ratten herhaaldelijke onder narcose te brengen. Naar mening van de DEC is het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven, matig voor alle dieren, juist ingeschat en geclassificeerd.
12. De integriteit van zowel de cavia's als de ratten wordt aangetast door de beperking van vrijheid en natuurlijk gedrag. Ook zijn de haarloze cavia's gevoelig voor temperatuurwisselingen en kunnen ze makkelijk beschadigingen oplopen. Op dat punt is hun integriteit aangetast. Bij de huisvesting wordt hier rekening mee gehouden.
13. Op basis van ervaring, voorzien de aanvragers dat er zich geen omstandigheden voor zullen doen, doen waarbij het toepassen van humane eindpunten noodzakelijk is. De DEC is van mening dat dit een juiste inschatting is.

3V's

14. Alhoewel er binnen dit project veel vooronderzoek gedaan wordt met in vitro methoden (met huidbiopten worden o.a. de prikeigenschappen van de micronaalden onderzocht), kunnen volledige immunologische responsen alleen in een diermodel bepaald worden. De DEC is van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven voorhanden zijn.
15. Het maximaal aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat op basis van een poweranalyse en literatuur en is proportioneel ten opzichte van de opzet en de doorlooptijd van het project.

16. Het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Op basis van de literatuur en ervaring valt niet te verwachten dat de dieren ongerief ondervinden van de vaccinaties. Echter zullen de dieren wel ongerief ondervinden van de individuele huisvesting (cavia's), de narcose (ratten) en het verbinden (ratten). De DEC is dan ook van mening dat de beschreven experimentele opzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het gaat hier om translationeel of toegepast onderzoek. Deze vraag is dus niet van toepassing.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal voor bijlage 1 alléén gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: "het geslacht kan invloed hebben op de immuunrespons, waardoor de variatie in de resultaten vergroot wordt. De poweranalyse voor de berekening van de groepsgrootte is gebaseerd op data met alleen vrouwelijke proefdieren". Dit zou kunnen worden opgelost door de verschillen tussen de geslachten eerst te onderzoeken in een apart experiment en dan de op basis van de resultaten de groepsgrootte voor een experiment met dieren van beide geslachten te bepalen. Dit zou relatief veel dieren en moeite vergen voor een experiment dat in deze vorm waarschijnlijk slechts één maal gedaan wordt. De aanvrager zal voor bijlage 2 alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: "De poweranalyse voor de berekening van de groepsgrootte is gebaseerd op data met alleen vrouwelijke proefdieren." Verder is er een duidelijk verschil tussen dit experiment, waarin men op zoek is naar subtiele verschillen in immuunresponsen tussen twee toedieningsmethoden en de standaard "potency testen" waarin wel gebruik gemaakt wordt van groepen van gemengd geslacht. Ook dit zou kunnen worden opgelost door de verschillen tussen de geslachten eerst te onderzoeken in een apart experiment en dan de op basis van de resultaten de groepsgrootte voor een experiment met dieren van beide geslachten te bepalen. Dit zou relatief veel dieren en moeite vergen voor een experiment dat in deze vorm waarschijnlijk slechts één maal gedaan wordt. De DEC is van mening dat de aanvrager in beide gevallen in voldoende mate onderbouwt waarom gekozen is voor het gebruik van één geslacht.
19. De dieren zullen worden gedood met een dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doding is noodzakelijk voor het isoleren van bloed. Daarmee kunnen de verschillende analyses uitgevoerd worden en kan er zoveel mogelijk informatie uit de dierproef gehaald worden.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van het ontwikkelen van nieuwe intradermale toedieningsmethoden voor vaccins (directe doel) en het waarborgen de volksgezondheid (uiteindelijke doel) het ongerief dat de dieren zullen ondervinden en de integriteits-

aantasting van de dieren?

2. De integriteit en het welzijn van de dieren worden in dit project respectievelijk in geringe mate en matig aangetast (zie C9 tot C20). Daar staat tegenover dat dit project bijdraagt aan het ontwikkelen van nieuwe toedieningsmethoden voor vaccins en daarmee een bijdrage kunnen leveren aan een breder geaccepteerde en veiligere vaccinatiestrategie. Uiteindelijk draagt dit bij aan het waarborgen van de volksgezondheid. Dit dient zowel een groot economisch belang als een groot volksgezondheidsbelang. De DEC kent daar veel gewicht aan toe.

3. De DEC is overtuigd van het belang van het ontwikkelen van nieuwe intradermale toedieningsmethoden voor vaccins (directe doel) en het waarborgen de volksgezondheid (uiteindelijke doel), en vindt dat de kennis en kunde van de aanvragers het aannemelijk maken dat de directe doelstellingen behaald worden binnen de looptijd van het project. De DEC is tevens van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven voorhanden zijn, dat het aantal dieren realistisch is ingeschat en dat het project in overeenstemming is met de vereisten voor verfijning van dierproeven. Alles afgewogen mag geconcludeerd worden dat het belang van de doelstellingen en de haalbaarheid van het project, het matige ongerief dat de dieren ondervinden als gevolg van de vaccinaties en de geringe aantasting van de integriteit van deze dieren, kunnen rechtvaardigen. Aan de eis, dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is unaniem tot stand gekomen.
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

PD ALt / Intravacc

Postbus 450

3720 AL BILTHOVEN



**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
AVD326002017901

Bijlagen

2

Datum 9 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 9 maart 2017. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van micronaalden als alternatief vaccin toedieningsvorm". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD326002017901. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

9 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD326002017901

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
9 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD326002017901

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 32600
Naam instelling of organisatie: PD Alt / Intravacc
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 52511170
Straat en huisnummer: Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
Postbus: 450
Postcode en plaats: 3720 AL BILTHOVEN
IBAN: NL741NGB0705003612
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: PD Alt

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
9 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD326002017901

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 450
Postcode en plaats: 3720 AL BILTHOVEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017
Geplande einddatum: 31 december 2018
Titel project: Ontwikkeling van micronealden als alternatief vaccin toedieningsvorm
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van micronealden als alternatief vaccin toedieningsvorm
Naam DEC: DEC ALT
Postadres DEC: Postbus 450, 3720 AL Bilthoven [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:

9 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD326002017901

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Bilthoven
Datum: 9 maart 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

PD Alt / Intravacc

Postbus 450

3720 AL BILTHOVEN



**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
AVD326002017901

Bijlagen

2

Datum 9 maart 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 9 maart 2017

Vervaldatum: 8 april 2017

Factuurnummer: 170901

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD326002017901	€ 1.187,00

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.

Project 32600 2017 901

Vragen CCD + antwoorden/reactie onderzoeker:

-De 3V's zijn vrij summier beschreven. In bijlage 3.4.4.2 heeft u bovendien niet aangegeven waarom het niet mogelijk is de doelstellingen te behalen zonder het gebruik van dieren. U wordt verzocht deze informatie alsnog aan te leveren.

De extra informatie is toegevoegd aan de bijlage.

-Het aantal dieren in de NTS komt niet overeen met het in de aanvraag beschreven aantal dieren. U wordt verzocht aan te geven wat correct is en de NTS en aanvraag met elkaar in overeenstemming te brengen.

Het aantal dieren is gecorrigeerd in de NTS.

-De aangevraagde looptijd van de vergunning komt niet overeen met de looptijd van het project in de NTS. U wordt verzocht aan te geven wat correct is en de NTS en aanvraag met elkaar in overeenstemming te brengen.

De looptijd van de vergunning is aangepast in de NTS.

Uit uw aanvraag blijkt niet of u mannelijke en vrouwelijke dieren gaat gebruiken. U wordt verzocht dit alsnog aan te geven. Mocht u of alleen vrouwelijke of alleen mannelijke dieren gebruiken, wordt u verzocht toe te lichten waarom dat voor het behalen van uw doelstelling noodzakelijk is.

In de beschrijving van de dierproeven staat voor beide dierproeven onder kopje B (De Dieren) reeds aangegeven welk geslacht dier er per dierproef wordt gebruikt en de toelichting daarbij.

De aangepaste NTS, bijlage/dierproef 1 en bijlage/dierproef 2 zijn aangepast.

Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 1 | Immunologische evaluatie van een vaccin toegediend met holle micronaalden |
- 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 aan te tonen dat intradermale administratie van een vaccin met de micronaaldapplicator mogelijk is, wordt de micronaald-applicator eerst getest in een dierstudie. Als modelvaccin wordt een influenza vaccin gebruikt; influenza vaccins worden al succesvol in mensen via de intradermale route toegediend. Van dit vaccin is dus al bewezen dat het beschermende immuunresponsen na intradermale toediening kan induceren.

De holle micronaalden zijn ontworpen om met een applicator toegediend te worden. Deze applicator vormt een integraal onderdeel met de holle micronaalden.

De studie bestaat uit twee onderdelen; in het eerste onderdeel worden de biotechnici getraind in het gebruik van de micronaald-applicator op de dieren. Tevens wordt daar de optimale injectiediepte voor de proefdieren bepaald.

Het tweede onderdeel van de studie bestaat uit de immunisatiestudie.

Deel 1: Training en optimalisatie van micronaald-applicator

Er zullen eerst enkele oefenvaccinaties uitgevoerd worden om het gebruik van de micronaald applicator te trainen. Tevens moet de bloedafname bij cavia's getraind worden door de biotechnici. Door deze training willen wij het risico op fouten tijdens de vaccinatiestudie zo klein mogelijk maken.

Tevens zal er worden gekeken of de micronaald-applicator inderdaad correct intradermaal vaccineert in de dieren. Hiervoor zullen de injecties uitgevoerd worden met een kleurstof, waarna bepaald kan worden hoe diep is geïnjecteerd. De intradermale toediening is succesvol als er geen kleurstof wordt gevonden in subdermale weefsels.

Deel 2: Immunisatiestudie

In de dierstudie zullen vier verschillende experimentele groepen getest worden: 1) Influenza vaccin intradermaal geïnjecteerd met de holle micronealden; 2) influenza vaccin intradermaal geïnjecteerd met conventionele spuit en naald; 3) influenza vaccin intramusculair geïnjecteerd met conventionele spuit en naald en 4) zoutoplossing intradermaal geïnjecteerd met de holle micronealden.

Centraal in de studie staat de vergelijking tussen intradermale toediening via de holle micronealden en intradermale toediening met conventionele spuit en naald; verwacht wordt dat de holle micronealden gelijkwaardig zijn. Als positieve controle is de intramusculaire injectie geïncorporeerd; dit is de normale vaccin toedieningsroute in proefdieren. Als negatieve controle wordt er een zoutoplossing met de holle micronealden intradermaal toegediend; deze zouden geen immuunrespons moeten opwekken.

De primaire uitkomstparameters zijn influenza-specifieke antistoftiters in het serum. Er wordt verwacht dat het vaccin toegediend met de holle micronealden het even goed doet als de intradermale controlegroep met spuit en naald; eventuele verschillen tussen de groepen zullen met een one-way ANOVA worden aangetoond.

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 dieren zullen tijdens het experiment elk tweemaal worden gevaccineerd met de vaccins genoemd in voorgaande sectie. Er wordt twee keer gevaccineerd om te garanderen dat er meetbare immuunresponsen worden opgewerkt. Eerdere studies met influenzavaccins in cavia's laten zien dat één enkele vaccinatie soms niet immunogeen genoeg is (Bonificio et al.; Fabrication of cell culture-derived influenza vaccine dissolvable microstructures and evaluation of immunogenicity in guinea pigs; Vaccine, 2015). De vaccinaties zullen plaatsvinden op dag 0 en dag 21 onder verdoving. Deze tijdstippen zijn geselecteerd aan de hand van bestaande literatuur over influenza vaccins in cavia's (waaronder bovengenoemde referentie). Op dag 35 worden de dieren geëuthanaseerd. Op dagen 0, 14, 21 wordt er van elk dier een bloedafname gedaan. Op dag 35 worden de dieren verbloed. In het bloed van deze bloedafnames worden de influenza-specifiek antistoftiters bepaald.

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

Het aantal dieren is berekend met een poweranalyse, gebaseerd op het vergelijken van de logaritmes van antistoftiters van twee groepen door een eenzijdige t-toets. Hiermee is rekening gehouden met een significantieniveau van 0.05 en een gewenste power van 80%. De standaarddeviatie op de readout (log antistoftiters) wordt geschat op 10% (op basis van eerdere studies in de literatuur met cavia's geïmmuniseerd met influenzavaccins), en we willen een effect size van minimaal 15% aantonen. Hieruit volgt dat er ongeveer 10 dieren per groep benodigd zijn.

B. De dieren

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

In deze dierstudie zal gebruik gemaakt worden van haarloze cavia's (hairless Hartley guinea pigs) afkomstig uit geregistreerde proefdierfok in binnen- of buitenland. Door haarloze dieren te gebruiken is het makkelijker om met de holle micronealden intradermaal te injecteren; er hoeft niet geschoren te worden. Scheren kan leiden tot irritatie van de huid, wat de lokale immuunrespons in de huid kan beïnvloeden. Verder is er bewijs dat de huid van de haarloze cavia veel overeenkomsten heeft met humane huid, met name qua dikte en structuur (Sueki et al.; Hairless guinea pig skin: anatomical basis for studies of cutaneous biology; European Journal of Dermatology, 2000).

Er zullen enkel vrouwelijke dieren gebruikt worden van 7-8 weken oud (ongeveer 400 gr.); het geslacht kan invloed hebben op de immuunrespons, waardoor de variatie in de resultaten vergroot wordt. De poweranalyse voor de berekening van de groepsgrootte is gebaseerd op data met alleen vrouwelijke proefdieren. Een studie om de optimale groepsgrootte te bepalen voor 2 geslachten zal erg veel dieren kosten. Omdat dit een eenmalige proef is, en het totaal aantal dieren vrij beperkt is, willen wij ons beperken tot enkel vrouwelijke dieren.

Het benodigde aantal dieren voor deze proef wordt geschat op 90. Er zijn 10 dieren benodigd om de applicator voorafgaande aan de immunisatieproef te testen. Voor de immunisatieproef wordt het aantal benodigde dieren geschat op 40. Er worden nog eens 40 dieren begroot voor een tweede proef indien de eerste proef herhaald moet worden. Herhaling is wellicht nodig door onverwachte uitval van de dieren (door bijvoorbeeld een onverwachte infectie in de dieren tijdens de 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.

Naast deze dierstudie zal de microneaald-applicator ook getest worden op humane huidbiopten. Hiermee worden de prikeigenschappen van de microneaalden onderzocht en indien nodig geoptimaliseerd voor gebruik in de mens. Er kunnen echter geen immunologische responsen worden opgewekt in huidbiopten. Ook bestaat er geen ander in vitro model om de immunogeniciteit van het vaccin toegediend door de microneaald-applicator te testen.

Het minimale aantal dieren om statistische verschillen aan te tonen is berekend door middel van een poweranalyse. Zo wordt voorkomen dat er (statistische) onbruikbare data uit de dierproef komt. Omdat de nieuwe immunisatiemethode het vaccin met hoge snelheid injecteert, is er gekozen om een groter diermodel (de haarloze cavia) te verkiezen boven een kleine dier zoals de muis. Een ander belangrijke factor is dat de huid van haarloze cavia's in meerdere opzichten gelijk is aan mensenhuid, wat van belang kan zijn voor het prikken van de microneaalden.

De microneaaldapplicator zal voor deze studie worden geoptimaliseerd voor intradermale toediening in dieren (zie proefopzet in deze bijlage). Tevens zullen dan de biotechnici getraind worden in het gebruik van microneaald-applicator. Hierdoor wordt er voorkomen dat er onnodige fouten worden gemaakt tijdens het uitvoeren van deze proef, wat de kans op nadelige effecten op de dieren verkleint.

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 tijdens de vaccin toediening onder anesthesie gebracht om angst bij de dieren te verminderen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Niet van toepassing.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

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?

De huid van de dieren kan makkelijk beschadigd worden omdat ze haarloos zijn. Ook kunnen de dieren zich moeilijker warm houden. Er wordt geen pijn verwacht van de injectie met de micronaald-applicator, omdat deze intradermaal (tussen de dermis en epidermis) injecteert, waar geen zenuwen liggen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Haarloosheid van de dieren.

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

Aangezien de dieren haarloos zijn, zal er een speciale ondergrond worden toegepast. Tevens zullen de dieren individueel gehuisvest worden om verwondingen aan de huid te voorkomen. Ook zal de temperatuur van hun leefomgeving aangepast worden.

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 cumulatief ongerief voor de dieren wordt geschat op matig. De dieren worden intradermaal of intramusculair geïnjecteerd, wat niet erg belastend is voor de dieren. Echter, doordat de dieren haarloos zijn kunnen ze ongerief ondervinden door de individuele huisvesting. We verwachten geen bijwerkingen van het influenza vaccin.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dieren worden aan het einde van de proef verbloed. Voor onze uitleesparameters is er zo veel mogelijk serum nodig voor verschillende analysetechnieken.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Immunologische evaluatie van het intradermaal toedienen van een Polio vaccin d.m.v. een pleister (patch) met oplosbare solide micro naaldjes

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Om aan te tonen dat intradermale immunisatie met behulp van een pleister (patch) mogelijk is, wordt een pleister geformuleerd met vaccin en getest in een dierstudie. De pleister bestaat uit oplosbare micronaaldjes. Na aanbrengen van de pleister prikken de micronaaldjes in de huid en lossen langzaam op. Het toedienen van micronaalden is pijnloos, dit omdat ze klein in omvang zijn en niet diep genoeg in het weefsel kunnen prikken om zenuwuiteinden of bloedvaten te kunnen raken. Om de werkzaamheid van de pleister te onderzoeken wordt als modelvaccin een polio vaccin gebruikt. Polio vaccins worden al succesvol in mensen via de intradermale route toegediend. Van dit vaccin is dus al bewezen dat het beschermende immuun responsen na intradermale toediening kan induceren. De studie bestaat uit een immunisatie studie in ratten waarbij gekeken wordt of na toediening van de pleister neutraliserende antistoffen opgewekt kunnen worden tegen het polio virus. Om het concept te kunnen testen wordt er gekozen voor een formulering met monovalent (1 type poliovirus) en trivalent vaccin (3 typen poliovirus). Met het monovalent vaccin wordt onderzocht of het concept van intradermaal vaccineren met micronaalden polio vaccin effectief is (proef 1). Indien dit het geval is zal de proef herhaald worden voor een trivalent vaccin waarbij de robuustheid van het concept getest wordt doordat er met meerdere serotypes poliovaccin tegelijkertijd geïmmuniseerd wordt. N.B. voor optimale bescherming tegen het poliovirus is een vaccinatie met een trivalent vaccin noodzakelijk.

In de dierstudie voor het Polio vaccin zullen vier verschillende experimentele groepen getest worden:
 1) polio vaccin intradermaal toegediend op het oor van het dier met een pleister. Er worden 2 verschillende pleisters geformuleerd met monovalent en trivalent vaccin. Beiden patches worden getest in 3 verschillende vaccin concentraties.

- 2) polio vaccin intramusculair geïnjecteerd met de conventionele spuit en naald (monovalent en trivalent, 3 vaccin concentraties). Intramusculaire injecteren is 1 van de conventionele manieren van vaccineren met poliovaccins. Deze groep is toegevoegd om een directe vergelijking te kunnen maken met de intradermale toediening via de pleister.
- 3) intramusculair injectie van monovalent en trivalent vaccin opgelost uit de pleisters met de hoogste vaccin concentratie. Deze groep wordt geïncludeerd om aan te kunnen tonen dat het virus niet zijn werking heeft verloren na formuleren van de pleisters. De aanwezigheid van virus antigenen worden voorafgaand aan de dierstudies in vitro getest echter de werkzaamheid, het opwekken van neutraliserende antilichamen, kan alleen in vivo in een dierproef getest worden.
- 4) controle groep voor de intradermale toediening, vaccineren van dieren met mock geformuleerde pleister. Deze patch bestaat uit alle oplosbare bestanddelen waarvan de micronealdjes gemaakt zijn met uitzondering van het vaccin. Omdat deze patches geen vaccin bevatten zal er ook geen immuunrespons opwekt worden.

Samengevat:

Proef	Groep	Route toediening	Wijze toediening	Poliovaccin	Vacin dosis		
					Hoog	Middel	Laag
1					Hoog	Middel	Laag
	1	Intradermaal	pleister met micronealden	sIPV monovalent	10	10	10
	2	Intradermaal	pleister met micronealden	formuleringsbuffer (1)	10		
	3	Intramusculair	opgeloste micronealden	sIPV monovalent	10		
	4	Intramusculair	vloeibaar vaccin	sIPV monovalent	10	10	10
2					Hoog	Middel	Laag
	1	Intradermaal	pleister met micronealden	sIPV trivalent	10	10	10
	2	Intradermaal	pleister met micronealden	formuleringsbuffer (2)	10		
	3	Intramusculair	opgeloste micronealden	sIPV trivalent	10		
	4	Intramusculair	vloeibaar vaccin	sIPV trivalent	10	10	10

Centraal in de studie staat de vergelijking tussen intradermale toediening (i.d.) via de pleister en de intramusculair toediening (i.m.) met conventionele spuit en naald; de vraag is of het gebruik van de pleister net zo effectief of beter zal zijn in het opwekken van neutraliserende antilichamen dan de conventionele methode met spuit en naald. De intramusculaire toediening is de normale vaccin toedieningsroute voor het testen van polio vaccin in proefdieren.

De primaire uitkomstparameters zijn polio-specifieke neutraliserende antistof titers in het serum, welke in de mens correleren met bescherming.

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 dieren zullen tijdens het experiment elk tweemaal gevaccineerd worden met de vaccins genoemd in voorgaande sectie. De vaccinaties zullen plaatsvinden op dag 0 en dag 21 onder verdoving. Op dagen 0, 21 en 28 wordt er van elk dier, onder verdoving een bloedafname gedaan en gewogen. Op dag 42 worden de dieren onder verdoving gewogen en geëuthanaseerd door verbloeding.

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

Primaire doelstelling is het aantonen van seroconversie na intradermale vaccinatie met poliovaccin waarbij de neutraliserende antilichaam titers hoger of tenminste gelijk zijn aan de titers geïnduceerd na intramusculaire vaccinatie. Titers groter dan een 8x serum verdunning worden beschouwd als positief. Uit eerdere experimenten is gebleken dat met een groepsgrootte van n=10 dieren (sample size calculator(<http://www.openepi.com>)) een medisch relevant verschil, namelijk een 'effect size' van 15%, aangetoond kan worden tussen de hoogste (gekozen op basis van 100% seroconversie) en laagste vaccinverdunning met 80% kans. Deze berekening betreft het vergelijken van twee groepen door een eenzijdige t-toets op significantie niveau van 5%.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia.

In deze dierstudie zal gebruik gemaakt worden van ratten afkomstig uit geregistreerde proefdierfok in binnen- of buitenland. Er zullen enkel vrouwelijke dieren gebruikt worden van 6-8 weken oud; De poweranalyse voor de berekening van de groeps grootte is gebaseerd op data met alleen vrouwelijke proefdieren. Een studie om de optimale groeps grootte te bepalen voor 2 geslachten zal erg veel dieren kosten. Omdat dit een eenmalige proef is, en het totaal aantal dieren vrij beperkt is, willen wij ons beperken tot enkel vrouwelijke dieren.

Geschatte aantallen:

Groep 1: 1 vaccin in 3 concentraties getest a 10 dieren per conditie is : $1 \times 3 \times 10 = 30$ dieren

Groep 2: 1 vaccin in 3 concentraties getest a 10 dieren per conditie is: $1 \times 3 \times 10 = 30$ dieren

Groep 3: 1 vaccin in 1 concentratie getest a 10 dieren per conditie is: $1 \times 10 = 10$ dieren

Groep 4: controle groep, 1 conditie a 10 dieren $1 \times 10 = 10$ dieren

Totaal aantal dieren per proef = **80**

Totaal aantal dieren per 2 proeven (vaccinatie met monovalent en trivalent vaccin) = **160** dieren

Er worden nog eens 160 dieren begroot voor herhaling van beiden proef. Dit aantal is behoudens eventuele aanpassingen in de vaccin concentraties en/of, aantal immunisaties en/of locatie van aanbrenge (flank i.p.v. oor) van de patches waardoor het experiment herhaald moet worden.

Totaal aantal dieren voor gehele aanvraag 2 experimenten x 160 dieren per experiment = **320** dieren

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.

Stimulatie van de productie van neutraliserende antilichamen is een wereldwijd geaccepteerde maat voor de effectiviteit van vaccins. Bij de productie van neutraliserende antilichamen zijn verschillende soorten immuuncellen betrokken. Op dit moment kan deze immuunrespons niet in vitro nagebootst worden, waardoor het noodzakelijk is om de productie van neutraliserende antilichamen met een dierproef te onderzoeken.

Het minimale aantal dieren om statistische verschillen aan te kunnen tonen is berekend door middel van een poweranalyse en bevestigd in verschillende studies. Zo wordt voorkomen dat er (statistische) onbruikbare data uit de dierproef komt. De capaciteit van een polio vaccin om neutraliserende antilichamen te induceren kan getest worden in kippen, cavia's of ratten diermodel. Binnen ons instituut is ervaring met het ratten model en alle analyse methodes zijn gebaseerd op het analyseren van ratten sera.

De test om poliovaccins te testen op werkzaamheid is gestandaardiseerd; deze test wordt in ratten uitgevoerd. Daarom is er gekozen om voor deze micronaald-vaccin combinatie de rat te gebruiken als diermodel.

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 tijdens alle vaccin toedieningen en bloedafnames onder anesthesie gebracht om zo de angst bij de dieren te verminderen.

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 micronaaldjes op de pleister zijn nog niet eerder geformuleerd geweest met het polio vaccin en zal in deze hoedanigheid voor het eerst in dieren getest worden.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Geen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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 cumulatief ongerief voor de dieren wordt geschat op matig, omdat de dieren herhaaldelijk onder narcose worden gebracht. De dieren worden intradermaal (pleister op de huid) of intramusculair geïnjecteerd, wat niet erg belastend is voor de dieren. We verwachten geen bijwerkingen van het polio vaccin.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dieren worden aan het einde van de proef verbloed. Voor onze uitleesparameters is er zo veel mogelijk serum nodig voor verschillende analysetechnieken.

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



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

PD Alt / Intravacc

Postbus 450

3720 AL BILTHOVEN

**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
AVD326002017901

Bijlagen

1

Datum 20 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 9 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van micronaalden als alternatief vaccin toedieningsvorm" met aanvraagnummer AVD326002017901. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 31 maart 2017 hebben wij vragen gesteld over de 3V's, het ongerief dat de dieren ondergaan en de aangevraagde looptijd van de vergunning. Wij kunnen ons vinden in uw toelichting.

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 "Ontwikkeling van micronaalden als alternatief vaccin toedieningsvorm" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 april 2017 tot en met 31 december 2019.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Alt gevoegd. Dit advies is opgesteld op 9 maart 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 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD326002017901

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


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: PD ALT / Intravacc
Adres: Postbus 450
Postcode en plaats: 3720 AL BILTHOVEN
Deelnemersnummer: 32600

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 april 2017 tot en met 31 december 2019, voor het project "Ontwikkeling van micronaalden als alternatief vaccin toedieningsvorm" met aanvraagnummer AVD326002017901, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC ALT. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Wetenschappelijk medewerker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 april 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 maart 2017, ontvangen op 9 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Immunologische evaluatie van een vaccin toegediend met holle micronaalden				
	Cavia's (Cavia porcellus) /	90	100% Matig	
3.4.4.2. Immunologische evaluatie van het intradermaal toedienen van een Polio vaccin d.m.v. een pleister (patch) met oplosbare solide micro naaldjes				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	320	100% Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:
AVD326002017901

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:

AVD326002017901

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:

AVD326002017901

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-09										
nr.	document NTS 2017904	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS initieel			x						
3	NTS definitief	x								
4	Projectvoorstel				x			x		
5	bijlage animal procedures				x			x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Brief verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
8	Mail verzoek aanvulling nts				x		x	x		
9	Reactie aanvullende vragen				x		x	x		
10	DEC advies				x		x	x		
11	Advies CCD		x							x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x		



16 MAART 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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <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>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>Instantie voor dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein 10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10	Postbus	9101	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10																
Postbus	9101																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	
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 checked="" 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 checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | Instantievoor Dierenwelzijn | |
| 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 2 . 0 4 . 2 0 1 7 |
| Einddatum | 1 2 . 0 4 . 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën voor preventie van pneumokokken infectie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | RU DEC 2016-0105 |
| Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam	[REDACTED]
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	13 - 03 - 2017
Handtekening	[REDACTED]

Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën voor preventie van pneumokokken infecties
1.2	Looptijd van het project	12-4-2017 - 12-4-2022
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Pneumokokken, vaccins, infecties, afweerrespons

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 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	De pneumokok is een bacterie die ernstige infecties kan veroorzaken bij de mens. Deze bacterie is de belangrijkste oorzaak van longontsteking wereldwijd, maar kan daarnaast ook zorgen voor hersenvliesontsteking, bloedvergiftiging en oorontsteking. Jaarlijks sterven meer dan 1 miljoen kinderen over de hele wereld aan een door pneumokokken veroorzaakte infectie en daarmee is het de belangrijkste doodsoorzaak voor kinderen onder de 5 jaar. Vaccineren is de meest effectieve manier om infecties te voorkomen. Er zijn vaccins beschikbaar die, in de landen waar ze gebruikt worden, het aantal en de ernst van pneumokokken infecties sterk verminderd hebben. Deze vaccins beschermen echter alleen tegen de meest voorkomende varianten van deze bacterie (maximaal 13 van de meer dan 90). De vaccins helpen nauwelijks tegen oorontsteking, doordat de meeste oorontstekingen worden veroorzaakt door varianten waar de huidige vaccins niet tegen beschermen. Ons onderzoek richt zich op het ontwikkelen van nieuwe vaccinatiestrategieën om bescherming op te wekken tegen alle varianten van de pneumokok. Om dit te bereiken zullen nieuwe componenten, formuleringen en vaccinatieroutes getest en vergeleken worden. Bijvoorbeeld het vergelijken en combineren van de toediening van vaccins via naalden of de neus. Hiermee kunnen we onderzoeken hoe een specifieke en effectieve afweerrespons opgewekt kan worden die leidt tot volledige bescherming tegen de pneumokok. Daarnaast kan de verkregen kennis over vaccinatiestrategieën tegen de pneumokok ook bijdragen aan de ontwikkeling van vaccins tegen andere ziekteverwekkers.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Met behulp van dit onderzoek verkrijgen we meer inzicht in de optimale bescherming tegen infecties veroorzaakt door de pneumokok. Dit zal bijdragen aan meer inzicht in de mogelijkheden om infecties door deze bacterie te voorkomen en zal leiden tot de ontwikkeling van nieuwe prototype vaccins. Deze informatie kan daarnaast een belangrijke bijdrage leveren aan de vaccinontwikkeling tegen andere ziekteverwekkers.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Maximaal 2560 muizen.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De dieren zullen tijdelijk stress ondervinden door injecties in hun spieren of huid, de afname van bloedmonsters, het bijkomen uit een verdoving. Sommige dieren krijgen een longontsteking en zullen hierdoor ziek zijn.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Voor de meeste muizen (84%) wordt licht ongerief verwacht, aangezien de muizen niet ziek zullen worden. Voor een beperkt deel van deze studie, maximaal 16%, wordt matig ongerief ingeschat, omdat deze dieren een luchtweginfectie krijgen die zich kan ontwikkelen tot een longontsteking.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? De dieren zullen worden gedood, waarna verschillende monsters afgenomen zullen worden voor verder onderzoek.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging** Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdierlijke alternatieven niet gebruikt kunnen worden. De afweerrespons opgewekt tegen vaccins en het effect van infectie met pneumokokken kan niet bestudeerd worden met proefdierlijke alternatieven. Een afweerrespons na vaccinatie leidt namelijk tot complexe interacties tussen de cellen van het immuunsysteem en andere weefsels die niet zonder proefdieren onderzocht kunnen worden.

4.2 **Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. We gebruiken niet meer dan het minimum aantal dieren dat nodig is, om tot betrouwbare resultaten te komen die niet aan het toeval zijn toe te schrijven. Variatie in de resultaten wordt zo veel mogelijk voorkomen, zodat er minder dieren nodig zijn.

4.3 **Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. Muizen hebben een vergelijkbaar afweersysteem als de mens en behoren tot de minder complexe diersoorten binnen de proefdiersoorten. Wij voeren ons onderzoek zoveel mogelijk uit in studies waarbij de muizen niet ziek worden, om zo het ongerief voor de muizen zo laag mogelijk te houden.

4.4 Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden. Binnen dit project maken we met name gebruik van milde experimenten waarbij muizen niet ziek worden. Dieren die een luchtweginfectie krijgen zullen drie keer per dag gecontroleerd worden. Wanneer de dieren meer ongerief hebben dan toegestaan voor dit experiment dan zullen ze uit de proef gehaald worden om onnodig lijden te voorkomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infections |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> 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.
-

The burden of respiratory infections by *Streptococcus pneumoniae*

World-wide, the burden of respiratory infections caused by the bacterium *Streptococcus pneumoniae* (the pneumococcus) is high, despite the availability of antimicrobial agents and childhood vaccines. The pneumococcus kills approximately 500,000 children of less than five years of age, each year, mainly in the developing countries (Source: World Health Organization). Therefore, it is the leading cause of childhood pneumonia and consequently the number one killer of children under five in the developing world. Pneumococcal disease can be treated with antibiotics, although antibiotic-resistant strains are emerging globally. Strategies that prevent the manifestation of pneumococcal disease are therefore of high importance.

Pneumococcal disease

The pneumococcus is normally carried in the nose or upper throat (nasopharynx) and up to 90% of children carry the bacterium asymptotically. Carriers can transmit the bacterium and nasopharyngeal colonization precedes pneumococcal infections. Especially elderly and children less than two years old are vulnerable to infections. The pneumococcus is the cause of serious invasive diseases such as pneumonia, meningitis and bacteremia. Pneumococci are also a common cause of middle ear infections and more than 60% of children have had at least one episode of acute otitis media in their first year. Middle ear infections are a frequent cause of a visit to a general practitioner and the use of antibiotics. Antibiotics such as penicillin are generally effective for treating pneumococcal infections, but growing resistance to conventional antibiotics underlines the urgent need for vaccines to be used to control pneumococcal disease.

Pneumococcal vaccines

All currently available pneumococcal vaccines are based on the capsular polysaccharide, either non-conjugated (23-valent) or conjugated (7,9,10&13-valent) to a carrier protein. Conjugate vaccines are efficacious against the homologous serotypes. However, more than 90 different serotypes have been identified so far and there is evidence that mass vaccination results in serotype replacement. Therefore, more serotypes need to be included for broader protection, which, however, has numerous technical and financial limitations. Also, current vaccines show limited protection

against otitis media. To enable broad protection against all serotypes, research on vaccines focuses on the development of a "common protein" vaccine, which has also the potential to protect against otitis media. Protein antigens with protective potential are currently being studied as new vaccine components (Miyayi et al. Cell Mol Life Sci. 2013 Sep; 70(18):3303-26).

Particulate-based vaccine formulations

The immunogenicity of antigens is dependent on the formulation. Antigens delivered in particles are better recognized by the immune system and are generally more effective than soluble antigens at stimulating protective immunity. Particulate formulations have comparable dimensions to pathogens and facilitate antigen uptake by antigen presenting cells, inducing a more effective type of immune response that corresponds with the natural immune response elicited by the bacteria itself (Lycke, Nat Rev Immunol. 2012 Jul 25;12(8);592-605; Rosenthal et al. 2014 Aug;28:51-8). Examples of particulate delivery systems include outer membrane vesicles (OMV), polymersomes and [REDACTED]. The advantage of OMV particles originating from Gram-negative bacteria is that these vesicles have intrinsic adjuvant activity supplied by various molecules, as well as the possibility to engineer these particles with integrated antigens of interest. (Acevedo et al. Front Immunol. 2014 Mar 24;5:121). Outer membrane vesicles can display a wide variety of antigens, thereby inducing an effective immune response. Polymersomes are FDA approved synthetic particles made for drug delivery. The composition, size, contents and cell-targeting properties of these particles can be engineered (Sharma et al. Biotechnol Adv. 2015; 33(1):64-79). Polymersomes allow the possible use of peptides derived from antigens, which are easier to produce than whole antigens, but are usually poorly immunogenic when administered in soluble form. On top of that, polymersomes can present antigens on their outside as well as release antigens from their internal side. [REDACTED] (Rivera and Espino, Exp Parasitol 2015). The optimal immune response induced by these particles can be addressed by varying particle characteristics and by the addition of immunomodulatory molecules with adjuvant properties that skew the immune response to elicit the proper anti-bacterial response (Sharma et al. Biotechnol Adv. 2015; 33(1):64-79).

Parenteral and mucosal vaccination routes

By far, most vaccines that are currently on the market are parenterally administered. Although this results in a systemic activation of the immune system, it complicates mass-vaccination programs and is not always leading to the most effective responses, especially in the case of mucosal (respiratory and gastrointestinal) infections. Evidence about the induction of a protective immune response against respiratory infections, via mucosal application of antigens is accumulating. Nevertheless, knowledge about the communication between the mucosal and systemic immune system is largely lacking, which is essential to enable vaccine implementation. Currently, no mucosal vaccine against *S. pneumoniae* has been developed. Natural colonization or carriage induces both mucosal and systemic humoral and cellular immune responses. Enhancing those responses by mucosal vaccination is an attractive immunization approach as it mimics the natural route of infection (Riese et al. Expert Opin Drug Deliv. 2014 Oct;11(10):1619-34). However, comparative studies are needed the effectiveness.

Prime-boost strategies To induce an effective long-lasting immune response multiple immunizations are often needed, referred to as prime-boost vaccination. Traditionally, priming and boosting is performed with the same vaccine and administered via the same route, resulting in a homologous immunization. However, combinations of different delivery platforms for priming and boosting can modulate the magnitude, quality and localization of the immune response. Data suggests that the combination of different vaccine delivery platforms using the same antigens, so called heterologous prime-boosting, may result in improved protection. Combinations of different particulate-based vaccine formulations are therefore of interest (Lu. Curr Opin Immunol. 2013 Aug; 21(3): 346-351). Similarly, the heterologous prime-boost approach can also be achieved by combining different routes of immunization. A combination of parenteral and mucosal vaccination, has the advantage of inducing immune responses in both the local and systemic compartments that are as strong or stronger than those resulting from homologous mucosal or parenteral vaccination alone (Fiorino et al. Front Immunol. 2013 Apr; 4(128)).

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The main objective of our project is to develop vaccination strategies that result in optimal protection against *S. pneumoniae*.

Research questions:

- Which particulate-based vaccine formulations (containing model antigens) results in the highest level of protection after parenteral vaccination?
- What is the mechanism underlying the communication between the mucosal and systemic immune system?
- Which prime-boost approach (particulate-based formulation + vaccination route) results in the highest level of protection?

Explanation of feasibility:

To accomplish the purpose of this study, the experiments will be performed by experienced scientists and biotechnicians who have been involved for many years in research on infectious diseases and vaccine development. All necessary facilities are accessible. The mouse vaccination and colonization model has been established for years and has frequently been used. Expertise on vaccine design and production is available within the Laboratory of Pediatric Infectious Diseases and the Radboud University. The design of the research plan is clear and focussed in order to make it feasible to achieve our main objective within the current project.

Salmonella outer membrane vesicles displaying high densities of pneumococcal antigen at the surface offer protection against colonization. Kuipers K, Daleke-Schermerhorn MH, Jong WS, ten Hagen-Jongman CM, van Opzeeland F, Simonetti E, Luirink J, de Jonge MI. *Vaccine*. 2015 Apr 21;33(17):2022-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.010.

The vaccine potential of Bordetella pertussis biofilm-derived membrane proteins. de Gouw D, Serra DO, de Jonge MI, Hermans PW, Wessels HJ, Zomer A, Yantorno OM, Diavatopoulos DA, Mooi FR. *Emerg Microbes Infect*. 2014 Aug;3(8):e58. doi: 10.1038/emi.2014.58.

Proteomics-identified Bvg-activated autotransporters protect against bordetella pertussis in a mouse model. de Gouw D, de Jonge MI, Hermans PW, Wessels HJ, Zomer A, Berends A, Pratt C, Berbers GA, Mooi FR, Diavatopoulos DA. *PLoS One*. 2014 Aug 18;9(8):e105011.

Two DHH subfamily 1 proteins contribute to pneumococcal virulence and confer protection against pneumococcal disease. Cron LE, Stol K, Burghout P, van Selm S, Simonetti ER, Bootsma HJ, Hermans PW. *Infect Immun*. 2011 Sep;79(9):3697-710. doi: 10.1128/IAI.01383-10.

Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines. Audouy SA, van Selm S, van Roosmalen ML, Post E, Kanninga R, Neef J, Estevão S, Nieuwenhuis EE, Adrian PV, Leenhouts K, Hermans PW. *Vaccine*. 2007 Mar 22;25(13):2497-506.

Lactococcus lactis GEM particles displaying pneumococcal antigens induce local and systemic immune responses following intranasal immunization. Audouy SA, van Roosmalen ML, Neef J, Kanninga R, Post E, van Deemter M, Metselaar H, van Selm S, Robillard GT, Leenhouts KJ, Hermans PW. *Vaccine*. 2006 Jun 29;24(26):5434-41.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Streptococcus pneumoniae is an important cause of severe infections such as pneumonia, meningitis, bacteremia and otitis media. People at risk of developing pneumococcal infections are young children, the elderly and immune-compromised persons. The pneumococcus is the leading cause of childhood pneumonia, the number one killer of children under five years in the developing world. The efficacy of the currently available vaccines is suboptimal as they do not protect against all serotypes, which leads to resurgence of pathogenic serotypes that are not covered by licensed vaccines. The development of efficacious vaccines with broad protection will have major benefits on reducing morbidity, mortality and health care costs. Exciting recent advances in immunology and biotechnology led to a shift from empirical vaccine testing to rational vaccine design, opening opportunities for a systematic approach to improve vaccines. Apart from the selection of new antigens to protect against the majority of circulating pneumococcal strains, also antigen formulation and delivery will determine the success of vaccination. As particles are generally better recognized by the immune system than single purified components (such as protein antigen). This leads to a better antigen uptake and processing leading to a more efficient and robust immune response. In this study we would like to explore the mechanisms of induction and persistence of the immune responses upon vaccination with particle-based vaccines. In addition we would like to study the influence of the delivery route (systemic and mucosal) on vaccine efficacy. This will lead to fundamental scientific knowledge that can be generally applied in the vaccine field.

3.4 Research Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Project is composed of three parts:

1. Testing antigen delivery systems for induction of broad protection via parenteral vaccination route
2. Comparing local and systemic immune responses via parenteral and mucosal vaccination routes.
3. Optimization of prime-boost strategies including various antigen delivery systems and vaccination routes.

Part 1.

Multiple particulate-based vaccines containing model antigens of *S. pneumoniae* are currently made which can be used in this study. This includes outer membrane vesicles, derived from different Gram-negative bacteria. Furthermore, polymersomes will be tested with different features including shape, size, antigen density and capsule thickness, all potentially contributing to vaccine efficacy. The potential of [REDACTED] as vaccine formulation will also be examined. All particulate-based vaccines will be tested in parenteral vaccination experiments with model Pneumococcal antigens that have already been shown to induce partial protection against colonization by pneumococci. We have chosen to select two model antigens, to avoid the need for having to test novel antigens in an early stage of the project, which would result in an increase in the total number of animal experiments. Based on our own experience and the available literature (K. Kuipers et al, Vaccine, 2015; 33(17), 2202-2209 & D.E. Briles et al, Vaccine, 1996; 14, 858-867), we know that this model antigens are (partially) protective against pneumococcal infections. These model antigens will be used as a control during the entire project. Approval for performing mucosal vaccination experiments with particle-based formulations using a colonization model has already been obtained.

Part 2.

Effective protection against *S. pneumoniae* should be mediated by both a potent systemic response and local immune response in the nasopharynx. To determine the optimal vaccination route, it is important to understand how the systemic and local immune response interact. We will compare the antigen localization after mucosal and parenteral vaccination route or a combination of both. This will include the localization of antigens and the immune response in different organs using in vivo imaging with labelled vaccine formulations. As immunological read-out the levels of humoral and cellular immunity will be measured.

Part 3. In order to induce a long-lasting, high quality immune response at the right location by vaccination, the route of administration and the vaccine formulation might be of importance. In part 3 we will test the potency of heterologous prime-boost strategies, meaning that we combine multiple vaccination routes or vaccine formulations in one vaccination scheme. This will involve a combination of parenteral and intranasal vaccination, or a combination of outer membrane vesicles, polymersomes and [REDACTED]. The results of part 1 and 2 will function as important input for this part of the study. The most promising particle-based strategy(ies) will be selected (part 1) and knowledge about the interaction between local and systemic immune system (part 2) will support the choice of the immunization strategy, this will therefore reduce the number of animals needed.

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.

To study the efficacy of the new vaccination strategies described above, we mainly focus on the vaccination-colonization model as shown in the flow chart. In the first phase of the project we will test the efficacy of different antigen delivery systems and study the effect of using different vaccination routes. To do this, we will examine the efficacy in colonization experiments and by imaging antigen and immune response localization. Both colonization and imaging are preceded by the same vaccination schedule.

Based on the experimental data obtained in the first phase, we will select several potent delivery systems and vaccination routes (phase 2). Combinations of these conditions will be tested in phase 3, which will provide us valuable information about the chosen prime-boost strategies. This data enables us to select a strategy that induces the highest level of protection against colonization (phase 4). Solely this vaccination strategy will be examined in the vaccination-pneumonia model (phase 5). This is because, next to colonization, an effective vaccine should be able to prevent against disease.

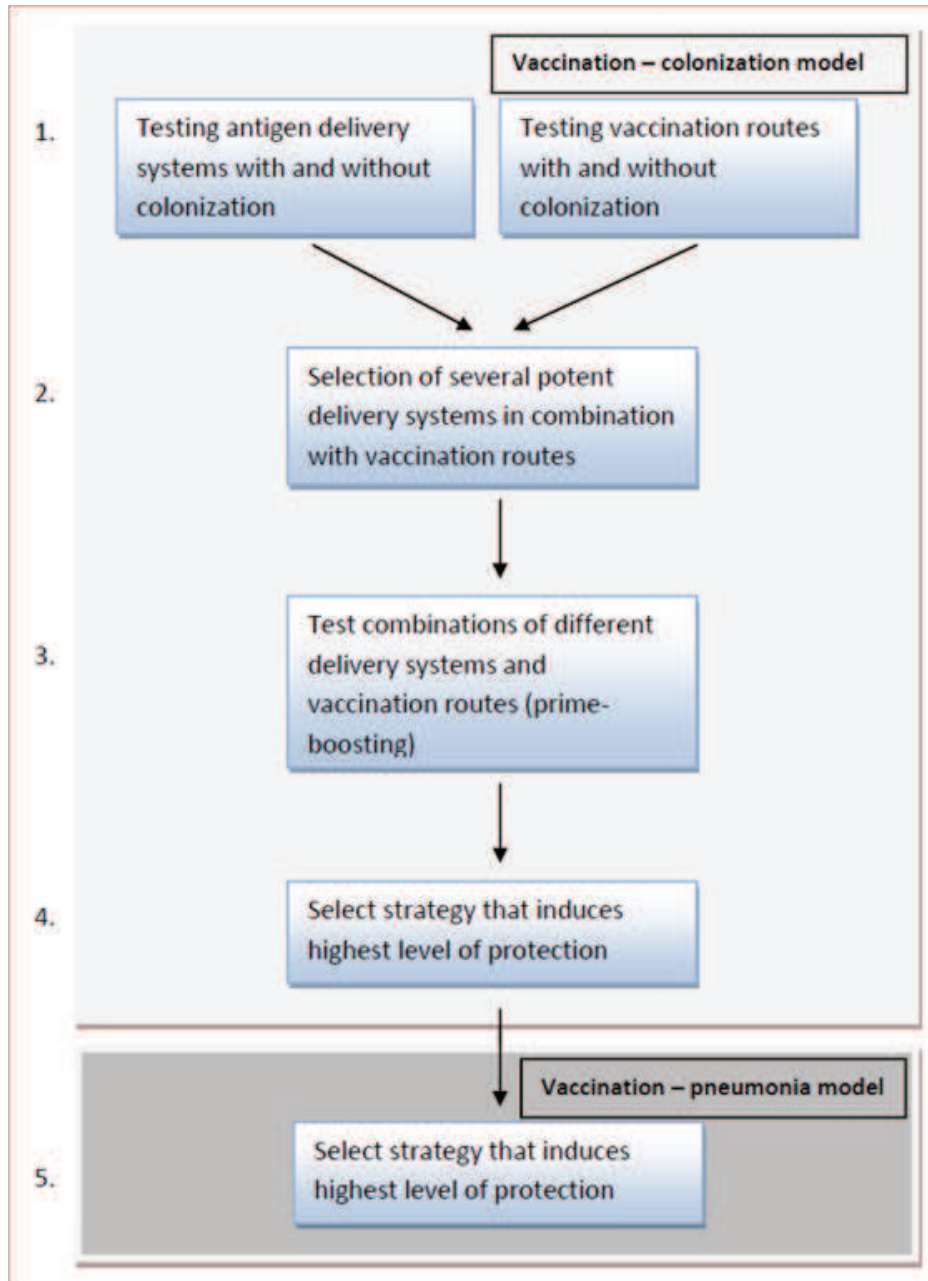
Using this step-by-step approach we will be able to identify new effective vaccination strategies that prevent both asymptomatic colonization and disease caused by *Streptococcus pneumoniae*.

The project will be started with multiple antigen delivery systems and vaccination routes that will be tested as described in the flow chart. However, delivery systems/vaccination routes will only be used in phase 2 if they result in (partial) protection against colonization by *S. pneumoniae* (phase 1). Thus we use the following criterion:

Go: at least partial protection against streptococcus pneumoniae

No go: no protection against streptococcus pneumoniae

Thereby we select the most potent strategies, which will be examined in the follow-up phases on the project. After each phase we will evaluate the potential of the strategy used based on the level of protection obtained. All the phases of the project will be performed using a limited number of promising antigen delivery systems/vaccination routes.



3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

The purpose of these studies are focussed on designing a vaccination strategy that results in protection against *S. pneumoniae*. Important features contributing to vaccine efficacy are the vaccine delivery system and the route of administration. Taken all three part of the project together, this provides the opportunity to find optimal induction of an effective immune response to protect against *S. pneumoniae* infections. Within this project a novel prime-boost strategy will be developed using particle-based vaccines. On top of that, fundamental knowledge about the interaction between mucosal and systemic immune system will be gained, which is essential to be able to produce effective vaccines.

The milestones covered by this 5-year project are:

- 1) Selection of particle-based vaccine(s) administered via parenteral vaccination that induce the highest level of protection against *S. pneumoniae*.
- 2) Selection of an strategy that combines mucosal and parenteral vaccination that results in an optimal immune response correlating with protection against *S. pneumoniae* has been found.
- 3) An optimized particle-based vaccine formulation containing model antigens administered via the optimal vaccination route has been found.

Optimal induction of an immune response is established by:

1. Strong reduction in the level of pneumococcal colonization in the upper respiratory tract and protection against pneumonia, as compared to negative control groups (indication of vaccine efficacy)
2. Antibodies in serum and nose lavages (indication of induction of immune responses)
3. Specific cellular immunity measured by specific T- and B-cell responses and production of cytokines important for clearance of pneumococcal colonization, such as IL-17 and IFN-gamma (indication of specific type of immune response).

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	Vaccination-colonization model
2	Vaccination-pneumonia model

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Vaccination-colonization model

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.

Vaccination-colonization model

The effectivity elicited by mucosal and parenteral administered pneumococcal vaccines will be determined in a vaccination-colonization model. This is a one of the mildest models available, since mice will not develop disease. In this model, vaccines will be administered intranasally under inhalation anaesthesia or parenterally without anaesthesia.

Subsequently, colonization in the nose is induced three weeks after the last immunization to ensure that proper immune induction has been elicited, and reduction in colonization together with immunological parameters is the read-out for vaccine efficacy.

The primary outcomes of the colonization experiments are:

- The level of colonization in the nasal cavity. A reduction in bacterial load or a reduction in the duration of colonization is an important parameter to establish vaccine efficacy.
- Antibody responses in nose lavages, nasal tissue or blood. Antibody titers are important parameters after vaccination to determine immunogenicity of the vaccine components
- Cellular immunity, such as cytokine analysis or studying specific immune cells can be performed in order to establish the specific characteristics of the immune response induced and their role in protection.

Alternatively, instead of inducing colonization, we will evaluate the vaccine and immune response localization over the course of two weeks after the last immunization.

The primary outcomes of the localization experiments are:

- Localization of 111-Indium labelled vaccine antigens. The ability of a vaccine to reach target organs and tissues is a measure for vaccine efficacy.
- Localization of the immune responses induced by the vaccine. By studying the immune responses at sites reached by the vaccine antigens, we gain insight into the specific characteristics of the immune response induced by the vaccine.

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

Mice will be immunized three times intranasally under inhalation anesthesia or parenterally without anesthesia. Parenteral vaccination may include intramuscular, subcutaneous and intracutaneous administration. Multiple routes will be evaluated because the used administration route may influence the protective effect of the vaccine, due to differences in the immune reaction. The volumes used are according to the Code of practice: Immunization. The animals will be immunized with 2-3 week intervals between immunizations, as done in our previous studies and based on optimal vaccination schedules as described for these type of vaccine studies. Vaccines will be composed of pneumococcal antigens administered with an adjuvant. The antigens used, will be administered as part of a particulate delivery system. Additionally, adjuvants can be administered for

optimization of the required immune response. Blood can be collected from the tail vein for preparation of serum before the first and 2 weeks after the final immunization samples in order to establish immunogenicity of the vaccines by determination of antibody titers. During colonization experiments, mice will be infected intranasally under inhalation anesthesia with a 10 µl volume. Mice will be sacrificed 1-14 days post infection, depending on the read-out timepoint required for the individual experiment. A nose lavage will be performed to collect bacteria from the nose in order to be able to determine primary and secondary read-out parameters. Inhalation anesthesia is used for the administration of intranasal vaccines and the infection dose in order to deliver this properly and reduce the spread to a minimum. During vaccine and immune response localization experiments, mice will be anesthetized by inhalation anesthesia maximally 3 times within two weeks after the third immunization. Furthermore, organs will be collected post mortem for further analysis.

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

The number of animals needed per group are calculated with a power analysis according to the following formula:

$$N = 2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot s^2 / d^2$$

The desired power is 0,80 with an alpha value of 0,05. In case multiple comparisons are performed, the alpha value will be corrected for the total number of comparisons and the $Z_{\alpha/2}$ will be adjusted accordingly. The minimum expected difference (d) will be set at 1 log on CFU counts and the estimated standard difference will be based on previous experiments. If a single control group is used in comparisons with multiple experimental groups, we were advised by a statistician to enlarge the size of this group.

B. The animals

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

Mouse species

The vaccination experiments, using both inbred and outbred mice, are well established in our laboratory. The inbred strains BALB/c and C57BL/6J are most commonly used in vaccination models described in literature. In BALB/c mice the immune response is predominantly Th2-skewed, while in C57BL/6J mice the response is predominantly Th1-skewed. The use of the (CB6)F1 generation hybrid mice of a cross between BALB/c and C57BL/6J allows studies in a more intermediate Th1/Th2 background. We will be using one mouse species for evaluating the potency of different particle based vaccine delivery systems and vaccination routes. However, as pneumococcal vaccines need to induce protection in a broad range of individuals it is important to allow the use of different mouse strains with a different Th1/Th2 skewing in the end when a selection of particles is made. As sex-based differences in susceptibility to pneumococcal infections have been described in literature (Kadioglu et al, 2011), the use of both sexes in this type of experiments has to be avoided to reduce spread (and group size) to a minimum and thereby lower the number of mice needed. For this reason publications about vaccine studies describe the use of either male or female mice, of which the majority uses females. Using both genders will inevitably lead to an increase in variation. This is explained by the following calculation: we expect (assumption) an increase of the standard deviation within a group when both sexes are used (e.g. σ increases from 1.2 to 1.5). To calculate the effect on the group size we use the formula: $N = 2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot \sigma^2 / d^2$. Alpha, power and the expected difference stay the same when using female mice or both sexes. The difference in number of animals needed when using only female mice or both sexes is therefore solely determined by

the standard deviation. The fold increase of the group size when using both sexes is determined as follows: $\sigma_{\text{female+male}} / \sigma_{\text{female}} = 1.52/1.22 = 1.6$

When using both sexes throughout the project, the number of mice needed will increase based on the expected increase of the standard deviation to: $2560 * 1.6 = 4000$ mice. Therefore, to reduce the total number of mice, we will use solely female mice.

On top of that, we prefer to use female mice over male mice, since they are easier to maintain in groups as they are less aggressive. When using males, this increases the likelihood of the need for individual housing of the animals for several weeks, which increases the discomfort.

Estimated number of animals

Taken together, as described in the proposal, there are 3 experimental parts that involve the vaccination model.

For the first part, the protection against *Streptococcus pneumoniae* by parenteral vaccination using particle-based vaccine delivery systems, we need a maximum number of 990 mice. First of all, we will perform a pilot experiment to compare different parenteral vaccination routes, including intramuscular, subcutaneous and intracutaneous, to establish the most optimal vaccination route. As we aim to do this with a model particle for all three particle based vaccine formulations (outer membrane vesicles, [REDACTED] and polymersomes) described in this study, we will use 90 mice divided over 9 groups of 10 mice. Based on this pilot we will select the most optimal parenteral vaccination route for each particle, which we will use during follow up experiments.

In order to establish the optimal induction of an immune response, three particle-based vaccine formulations will be studied for their capacity to protect against colonization by *Streptococcus pneumoniae* and their immune induction capacity. To be able to vary the particles according to size, shape, composition, the addition of adjuvants and display of the antigens, 5 experiments were estimated per particle studied, with 6 groups of around 10 mice per group.

Table 1 describes the groups for the experiment studying the effect of shape of one formulation.

Similar groups will be made when studying the effect of size, composition, antigen and adjuvants. This will make a maximum amount of 300 mice per particle, and a maximum number of 990 mice (including 90 animals for the pilot experiment).

Furthermore, the differences in localization of antigens and immunological responses by different vaccination routes and particles will be examined as measure of vaccine efficacy. For each particulate based formulation three particles with different features according to shape, size and display of antigen will be tested. This will result 9 experiments (3 different particles X 3 different variables), with 6 groups of around 10 mice per group. This will result in a experimental setup described in table 2, which is the same as shown in table 1 as a this time a only a different read-out will be performed.

Performing this experiment 9 times, results in a maximum of around 540 mice in total.

For the third part, to study the potential of heterologous prime-boost strategies in inducing good protection against *S. pneumoniae*. Again for each particulate based formulation one particle type will be chosen and tested in a combination of parenteral and intranasal immunization in one vaccination scheme, followed by the colonization procedure. On top of that different particles can be combined in one vaccination schedule. This will result in a total of 9 experiments, with 6 groups of around 10 mice.

Table 3 describes the experimental groups for a heterologous prime-boost experiment including intrasal (I) and parenteral (P) vaccination using particle X.

When performing combining different particles instead of different vaccination routes, this will result in a similar experimental setup. Based on the experimental setup, for 9 experiments we will need a maximum of 540 mice for this part of the project.

Finally, particles or vaccination schedules that showed to be promising, will be evaluated in different mouse strains. This will include a maximum of 3 experiments using 10 mice of each strain with three strains.

So, all three some strains will be vaccinated with, for example, particle X. This is shown in table 4.

When performing this type of experiment three times, this results in a total of 90 mice.

Combining all mice experiments, the total of number mice needed for this project is estimated to be $990 + 540 + 540 + 90 = 2160$

Table 1

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	Neg. control: solvent only	N=10
2	Neg. control: adjuvant only	N=10
3	Shape A +adjuvant	N=10
4	Shape B +adjuvant	N=10
5	Shape C +adjuvant	N=10
6	Shape D +adjuvant	N=10
		Total = 60 mice per experiment

Table 2

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	Neg. control: solvent only	N=10
2	Neg. control: adjuvant only	N=10
3	Shape A +adjuvant	N=10
4	Shape B +adjuvant	N=10
5	Shape C +adjuvant	N=10
6	Shape D +adjuvant	N=10
		Total = 60 mice per experiment

Table 3

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	Neg. control: P+P+P solvent	N=10
2	Neg. control: I+I+I solvent	N=10
3	P+P+P particle X	N=10
4	I+I+I particle X	N=10
5	P+I+I particle X	N=10
6	I+P+P particle X	N=10
		Total = 60 mice per experiment

Table 4

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	CB6F1, particle X	N=10
2	C57BL/6, particle X	N=10
3	BALB/c, particle X	N=10
		Total = 30 mice per experiment

Species Mouse: CB6F1, C57BL/9, BALB/c	Origin Registered breeding facility /supplier within EU	Maximum number of animals 2160	Life stage 6-8 weeks
--	---	-----------------------------------	-------------------------

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.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

Protective effects against of vaccination cannot be studied in vitro and requires animal models. The mouse colonization experiments are the most convenient small animal experiments that can be used to measure colonization and the lowest animal species sufficient to study this. Other colonization models are developed in rhesus macaques (Philipp et al., 2006) and ferrets (McCullers et al., 2010). Similar to colonization, the lowest animal species are sufficient to image antigen and immune response localization over time, but cannot be performed without animals.

Reduction

We will not use more animals than the minimal amount that is needed to obtain statistically significant differences between the groups. Intranasal immunization and all infection procedures are performed under inhalation anesthesia to reduce spread (and group size) to a minimum.

Refinement

The vaccination-colonization model is the mildest infection model, since these animals will not develop disease. The highest discomfort in this model will be awakening from anesthesia used for intranasal immunization and intranasal infection or imaging (depending on the read-out). Since studying vaccine efficacy cannot be performed without these immunizations and inducing infection/performing imaging, the experiment cannot be performed with less discomfort for the animals. We believe this is the best way to perform such an experiment with regard to optimal experimental outcome relevant for induction of protection and immune responses induced, with as little discomfort to the animals as possible.

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

The vaccination-colonization model is the mildest infection model, since the mice will not develop invasive disease. The highest degree of discomfort will be the awakening from the anesthesia used for the intranasal administration of the immunizations and the infection/imaging which is minimized by using inhalation anesthesia. To minimize adverse effects, we monitor the mice daily, and if necessary act according humane endpoints.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The vaccination-colonization model is a mild model, since mice will not develop invasive disease.

The mice will experience some discomfort caused by the use of anesthesia used for immunizations. However, for parenteral vaccination no anesthesia is needed, as discomfort due to anesthesia is higher compared to the vaccination procedure. In addition some discomfort will be caused by the use of anesthesia for induction of infection or the in vivo imaging.

If case serum or plasma is needed, mice will experience some discomfort of blood collection from the tail vein in order to obtain pre-immune and post immune sera in vaccination studies.

Explain why these effects may emerge.

The discomfort of the anesthesia is caused by waking up from anesthesia after intranasal vaccination, inducing colonization or imaging. The discomfort of blood collection from the tail vein is caused by pre-heating and some restrained while being pricked with a needle.

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

Inhalation anesthesia is used, which allows rapid induction and recovery. The number of times anesthesia is needed will be minimized. Blood collection from the tail vein and administration is performed by experienced researchers in order to reduce the discomfort to a minimum.

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.

The chance of manifestation of disease, i.e. sepsis or pneumonia, and reaching the humane endpoints is very unlikely in the described vaccination-colonization model. Therefore we focus on the general humane endpoints.

General Humane Endpoints

If there is more or unexpected discomfort during an animal experiment, related or not related to the experiment, one should evaluate if a humane endpoint should be applied.

Criteria for application of a humane endpoint are:

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

If any of these states is determined, mice will be removed from the experiment.

Indicate the likely incidence.

The chance of reaching humane endpoints will be very low, since using this model mice will not develop invasive disease. So human endpoints can be reached because of causes not linked to experimental procedures or low infection related incidence of less than 1%.

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).

The expected severity is mild for all mice, since mice will not develop disease.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

End of experiment. We need to assess bacterial recovery in the nasal tissue, for that we need to harvest nasal tissue by opening up the skull/nasal cavity. Furthermore we will collect organs for evaluating the localization of the immune response.

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

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Vaccination-pneumonia model</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Vaccination-pneumonia model
Serial number	Type of animal procedure					
2	Vaccination-pneumonia model					

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.

Pneumonia model

The protection elicited by vaccines against pneumonia will be determined in a vaccination-pneumonia model. Pneumonia will be induced by the pathogen solely, or in co-infection with influenza virus for strains that are not capable to induce pneumonia alone. This model will be used to establish the efficacy of particulate-based vaccine formulations, that have shown to be protective against colonization shown in the vaccination-colonization model. In these studies mice will be immunized 3 times intranasally or parenterally with the chosen vaccine formulations. In addition, the efficacy of prime-boost strategies shown to be effective in the vaccination-colonization model, will be tested in this vaccination-pneumonia model. In both cases, the protection induced against the development of pneumonia will be analyzed.

The primary outcomes of the pneumonia model are:

- Pneumococcal recovery from the nose and lungs as a reduction in pneumococci reflects the relevance of the specific responses studied and an important parameter to determine vaccine efficacy.
- Humoral immunity, such as antibodies or complement proteins in nose lavages, bronchoalveolar lavages and blood. The humoral immune response will be studied by analysis of different components among which the antibody responses are the most important to correlate with protection.
- Cellular immunity, such as cytokine analysis or studying specific immune cells will be performed in order to determine the type of immune induction and activation, correlating with protection, that is induced.
- Disease scores and weight of mice, which reflect the effect on the health status of the mice.
- Histology on lung samples.

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

The particle based vaccine formulations will be administered three times with a 2-3 weeks interval via intranasal or parenteral route with volume volumes according to the Code of practice: immunization. Intranasal, but not parenteral, vaccination will take place under anesthesia. Parenteral vaccination strategies will include e.g. subcutaneous, intramuscular or intracutaneous administration as determined in the vaccination-colonization model.

A mild infection with influenza A virus will be induced intranasally, which is essential for the induction of pneumonia in this model (depending on the bacterial strain used), applied in a 10 µl volume without anesthesia. Five days after virus administration, the mice will be infected intranasally with pneumococci in a maximum volume of 40 µl, under inhalation anesthesia. The read-out will be the amount of bacteria present in the nose after infection, as well as immunological parameters in blood and lung homogenates at maximally 72 hours after infection. The animals will be euthanized by terminal bleeding under inhalation anesthesia followed by cervical dislocation.

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

The number of animals needed per group are calculated with a power analysis according to the following formula:

$$N = 2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot s^2 / d^2$$

The desired power is 0,80 with an alpha value of 0,05. In case multiple comparisons are performed, the alpha value will be corrected for the total number of comparisons and the $Z_{\alpha/2}$ will be adjusted accordingly. The minimum expected difference (d) will be set at 1 log on CFU counts and the estimated standard difference will be based on previous experiments. If a single control group is used in comparisons with multiple experimental groups, we were advised by a statistician to enlarge the size of this group.

B. The animals

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

Mouse species

In the vaccination-pneumonia model, we will use solely one mouse strain. This will be one of two following inbred strains: C57BL/6J or BALB/c mice. In BALB/c mice the immune response is predominantly Th2-skewed, while in C57BL/6J mice the response is predominantly Th1-skewed. However, to identify the ideal mouse strain for the vaccination-pneumonia model described here, we will perform a pilot experiment to compare the different mouse strains.

As sex-based differences in susceptibility to pneumococcal infections have been described in literature (Kadioglu et al, 2011), the use of both sexes in this type of experiments has to be avoided to reduce spread (and group size) to a minimum and thereby lower the number of mice needed. For this reason publications about vaccine studies describe the use of either male or female mice, of which the majority uses females. Using both genders will inevitably lead to an increase in variation. This is explained by the following calculation: we expect (assumption) an increase of the standard deviation within a group when both sexes are used (e.g. σ increases from 1.2 to 1.5). To calculate the effect on the group size we use the formula: $N = 2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot \sigma^2 / d^2$. Alpha, power and the expected difference stay the same when using female mice or both sexes. The difference in number of animals needed when using only female mice or both sexes is therefore solely determined by the standard deviation. The fold increase of the group size when using both sexes is determined as follows: $\sigma_{\text{female+male}}^2 / \sigma_{\text{female}}^2 = 1.5^2 / 1.2^2 = 1.6$

When using both sexes throughout the project, the number of mice needed will increase based on the expected increase of the standard deviation to: $2560 \cdot 1.6 = 4000$ mice. Therefore, to reduce the total number of mice, we will use solely female mice.

On top of that, we prefer to use female mice over male mice, since they are easier to maintain in groups as they are less aggressive. When using males, this increases the likelihood of the need for individual housing of the animals for several weeks, which increases the discomfort.

Estimated number of animals

The maximum number of mice was calculated with a group size around 10 mice. For the first pilot we use 5 animals per group, to limit the use of animals when screening various conditions.

For the different research questions, the number of mice was estimated as follows:

For the first part, focusing on parenteral vaccination using particulate based vaccine formulations, we aim to establish the protection against pneumonia. To do this we need a model that results in pneumonia, but also enables us to study significant differences between vaccines. To do so, we will perform a pilot experiment to optimize dose, mouse species and bacterial strains that will be used in follow up experiments. 2 conditions per parameter will be examined, resulting in 8 different groups of 5 mice, making 40 mice in total. Table 1 shows an overview of this pilot experiment, with A and B representing the two different conditions of each parameter.

Subsequently, to optimize the timing of endpoint of the experiment a follow-up pilot experiment will be performed, including extra controls. Two conditions that showed promising result in de first pilot were tested again, using larger number of animals per group to enable statistic significant differences. This pilot will involve 6 groups of 10 animals, as shown in table 2. In total these pilot experiments need 100 mice.

The optimal condition of the pilot experiments will be selected and used in the follow-up experiments. For each particle one formulation will be tested that resulted in a significant reduction in colonization in the vaccination-colonization model. This results in 3 experiments, with 6 groups of around 10 mice. Table 3 describes the animal groups that will be used in this experiment. When performing this experiment three times, it makes a total of 180 mice.

For the second part, testing the efficacy of various prime boost strategies, solely the strategies that turned out to be effective against colonization will be evaluated. We expect to have 2 effective strategies in the colonization model. Therefore, this will result in maximally 2 experiments of 6 groups with 10 mice. Table 4 shows a prerepresentative experiment. Performing this twice, 120 mice will be needed.

The total number of mice is: $100 + 180 + 120 = 400$

Table 1

Group no.	Exp. conditions			Number of mice
	Dose	Mouse species	Bact. Strain	
1	A	A	A	N=5
2	A	A	B	N=5
3	A	B	A	N=5
4	B	A	A	N=5
5	A	B	B	N=5
6	B	B	A	N=5
7	B	A	B	N=5
8	B	B	B	N=5
				Total = 40 mice

Table 2

Group no.	Exp. conditions	Number of mice
1	Neg. control: solvent only, termination 48 h	N=10
2	Neg. control: solvent only, termination 72 h	N=10
3	Condition 1, termination 48 h	N=10
4	Condition 1, termination 72 h	N=10
5	Condition 2, termination 48 h	N=10
6	Condition 2, termination 72 h	N=10
		Total = 60 mice

Table 3

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	Neg. control: solvent only	N=10
2	Neg. control: adjuvant only	N=10
3	Particle X	N=10
4	Particle X + adjuvant	N=10
5	Positive control	N=10
6	Positive control + adjuvant	N=10
		Total = 60 mice per experiment

Table 4

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	Neg. control: P+P+P solvent	N=10
2	Neg. control: I+I+I solvent	N=10
3	P+P+P particle X	N=10
4	I+I+I particle X	N=10
5	P+I+I particle X	N=10
6	I+P+P particle X	N=10
		Total = 60 mice per experiment

Species
Mouse: C57BL/6, BALB/c

Origin
Registered breeding facility/supplier
within EU

Maximum number of animals
400

Life stage
6-8 weeks

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.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

Protective effects against pneumonia cannot be studied *in vitro* and requires animal models. The mouse vaccination-pneumonia model is the most convenient small animal model that can be used to measure pneumonia.

Reduction

All vaccination strategies used in the vaccination-pneumonia model, will first be tested in the vaccination-colonization model. We will solely test strategies in the vaccination-pneumonia model that have shown to be effective in the colonization model. Thereby we reduce the number of animals used in this model to a minimum. Furthermore, will perform a pilot experiment to reduce the total number of animals needed in this model. In addition, we will not use more animals than the minimal amount that is needed to obtain statistically significant differences between the groups and we will reduce variation in results as much as possible in order to reduce spread and group size to a minimum.

Refinement

Since our aim is to study effects of vaccines in preventing pneumonia, these experiments cannot be performed without the induction of disease. We will monitor the mice carefully and reduce the discomfort to a minimum. To do so, we perform a pilot experiment that enables us to identify the optimal conditions with minimal discomfort. We believe this is the best way to perform such an experiment with regard to optimal experimental outcome relevant for induction of protection and immune responses induced, with as little discomfort to the animals as possible.

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

The mice will be monitored three times per day after the infection. This to monitor possible humane endpoints in time and remove animals from the experiment when necessary to minimize animal suffering. By monitoring the mice multiple times during day time, we detect suffering in time and prevent the need for monitoring during the night.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

G. Location where the animals procedures are performed

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.

No analgesia will be used as this may interfere with the effectivity of the vaccination strategy used. We will try to reduce the discomfort for the mice to a minimum, by monitoring the mice carefully and setting the endpoint of the experiment at a time point when the mice will not reach the severe level of discomfort.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The animals are likely to suffer from labored breathing and lose weight.

All animals will experience some discomfort caused by awakening from the inhalation anesthesia that is used to administer the infection inoculums intranasally. In case serum or plasma is needed, mice will experience some discomfort of blood collection from the tail vein in order to obtain pre-immune and post immune sera in vaccination studies.

Explain why these effects may emerge.

These adverse effects are caused by the development of pneumonia.
Some discomfort is caused by awakening from the inhalation anesthesia.

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

Since our aim is to study the protective effect of vaccination strategies on the development of pneumonia, these studies cannot be performed without the discomfort induced. During the development of pneumonia, mice will be monitored multiple times a day. The vaccination-pneumonia model has often been used in our lab. Temperature measurements with an infrared thermometer on the skin have been introduced by us and is used in case of doubts on the health status of the mice.

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.

Mice involved in the vaccination-pneumonia model will experience discomfort as we study the efficacy of vaccines in preventing disease. To prevent mice from severe suffering and reaching the pre-mortem state, we use the following criteria:

- Loss of body weight of more than 15% in 1-2 days or more than 20% from the start of the experiment.
 - Abnormal behavior, ruffled coat, hunched back and severe reduced mobility.
 - When a drop in temperature below 35°C is measured with an infrared thermometer on the skin (only will be measured in case of doubts on health status)
-

Indicate the likely incidence.

In the vaccination-pneumonia model mice are expected to develop disease. The severity depends on the virulence of the pathogen and the effectiveness of the host immune system to kill the pathogen. Based on the pilot experiment described in this animal procedure we will estimate the development of disease, and since we want to sacrifice the mice at the same time point, we will set the endpoint of the experiment at a time point the humane endpoint will not be reached. So we estimate the incidence for human endpoint to be <10%. If the human endpoint is reached this will

probably be on 20% weight loss since the most strains that we use are known to be rapidly cleared from the blood stream after intranasal infection and are only able to induce pneumonia in co-infection with influenza A virus.

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).

For the development of pneumonia, a moderate level of severity is estimated for all mice. We have set our humane endpoint in a way that mice will not reach a the severe level of discomfort, as described in paragraph 'J. Humane Endpoints'.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

End of experiment. We need to assess bacterial recovery in the nose and lungs, for that we need to harvest nasal and lung tissue.

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

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

[Redacted]

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



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
AVD103002017904

Bijlagen

2

Datum 13 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 maart 2017. Het gaat om uw project "Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002017904. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

13 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017904

Datum:
13 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017904

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantievoor Dierenwelzijn
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: 12 april 2017
Geplande einddatum: 12 april 2022
Titel project: Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën voor preventie van pneumokokken infectie
Naam DEC: RU DEC 2016-0105
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

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:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:

Instantie voor dierenwelzijn

Plaats:

Nijmegen

Datum:

13 maart 2017

Datum:

13 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017904



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Groteplein 29
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN

[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
AVD103002017904
Bijlagen
2

Datum 13 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 13 maart 2017

Vervaldatum: 12 april 2017

Factuurnummer: 170904

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: [REDACTED]

projectnummer: 2016-0105 Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002017904	€ 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

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017904

Datum 17 maart 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Combining parenteral and mucosal vaccination strategies against pneumococcal infection" met aanvraagnummer AVD103002017904. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In uw aanvraag beschrijft u verschillende stappen/fases in de experimentele opzet, maar duidelijke go/no-go momenten en beslisriteria om wel dan niet verder te gaan met het experiment of met een onderdeel van het experiment ontbreken. We verzoeken u om aan te geven of er momenten in de strategie zijn opgenomen wanneer u zal beslissen om niet verder met het experiment/ een onderdeel van het experiment te gaan. Zo ja, welke beslisriteria worden toegepast?

Leges

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

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Datum:

17 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017904

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



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 Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD103002017904

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:

17 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017904

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

Info-zbo (zbo)

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 11 april 2017 16:15
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: leges en NTS aanvraag AVD103002017904

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft uw aanvraag met nummer AVD103002017904 en titel 'Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection' besproken.

In de Niet-technische samenvatting staat onder punt 4.4 'dan zullen ze uit de proef gehaald worden'. Om verwarring te voorkomen, verzoeken we u de zin aan te passen met bijv. 'dan zullen ze gedood worden'.

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

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de nieuwe NTS en de leges hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

1-AVD103002017904-reactie-(21-03-2017)

Vraag CCD:

In uw aanvraag beschrijft u verschillende stappen/fases in de experimentele opzet, maar duidelijke go/no-go momenten en besliscriteria om wel dan niet verder te gaan met het experiment of met een onderdeel van het experiment ontbreken. We verzoeken u om aan te geven of er momenten in de strategie zijn opgenomen wanneer u zal beslissen om niet verder met het experiment/een onderdeel van het experiment te gaan. Zo ja, welke besliscriteria worden toegepast?

Antwoord:

Naar aanleiding van deze onduidelijkheid is bij paragraaf 3.4.2. van de project proposal een alinea toegevoegd over de go/no-go procedure en de criteria. Na elke fase zal bekeken worden of de geteste antigen delivery systems/vaccinatie routes voldoen aan het criterium om door te kunnen naar de volgende fase. Het criterium dat we hierbij gebruiken is:

Go: (gedeeltelijke) bescherming tegen de pneumokok

No-go: geen bescherming tegen de pneumokok.

Aangezien gestart wordt met een screening van de meerdere antigen delivery systems/vaccinatie routes, is het zeker dat een selectie hiervan alle fases beschreven in dit project zal doorlopen.

Ik hoop hiermee mijn verbeteringen in de CCD aanvraag voldoende te hebben toegelicht.

Met vriendelijke groet,

██████████

Deze informatie is toegevoegd aan zowel het project proposal als de niet-technische samenvatting.

-3.4.1: De volgorde waarin de verschillende onderzoeksvragen worden onderzocht lijkt te verschillen tussen 3.2 en 3.4.1. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen dan wel te verduidelijken.

Antwoord: De volgorde van de project onderdelen, zoals genoemd onder 3.2 is aangepast zodat deze overeenkomt met de onderzoeksvragen gesteld in paragraaf 3.4.1. Deze aanpassing heeft geen verdere gevolgen op de volgorde van het geschreven project.

-3.4.1: Er worden modelantigenen gekozen in onderdeel 1. Op basis waarvan vindt deze keuze plaats? Hoeveel modelantigenen willen de onderzoekers testen en worden dezelfde modelantigenen vervolgens in de hele studie gebruikt?

Antwoord: We hebben gekozen voor twee modelantigenen, waarvan we op basis van onze eigen ervaring en informatie uit de literatuur weten dat deze antigenen (deels) bescherming bieden tegen infecties veroorzaakt door de pneumokok (K. Kuipers et al, Vaccine, 2015; 33(17), 2202-2209 & N. Kothari et al, Vaccine, 2015; 33(6), 783-788 & Z. Piao et al, Vaccine, 2014; 32(43), 5607-5613 & D.E. Briles et al, Vaccine, 1996; 14, 858-867). Deze modelantigenen zullen gedurende de gehele studie gebruikt worden als controle.

Description of animal procedures:

DAP1

-B: De onderzoekers vermelden dat het gebruik van beide geslachten vermeden dient te worden om de variatie te beperken, waardoor met kleinere groepen dieren kan worden gewerkt. Kunnen de onderzoekers dit onderbouwen met een (globale) berekening van het verschil in groeps grootte wanneer gemengde groepen gebruikt worden?

*Antwoord: Op basis van de literatuur is bekend dat mannetjes en vrouwtjes verschillend reageren op een pneumokokken infectie (Kadioglu et al, 2011). In de huidige literatuur met betrekking tot vaccine studies in muizen, worden veelal of mannetjes of vrouwtjes muizen gebruikt. Hierbij maakt de overgrote meerderheid van de studies gebruik van vrouwtjes muizen. Er is geen standaard deviatie bekend wanneer mannetjes en vrouwtjes muizen gecombineerd worden in één experiment. Aangezien er wel is bewezen dat het geslacht invloed heeft op de reactie op een pneumokokken infectie, nemen wij aan dat de standaard deviatie toeneemt zodra beiden geslachten worden gecombineerd. De volgende berekening toont aan dat een verhoging van de standaarddeviatie (σ van 1.2 naar 1.5) leidt tot een verhoging van het aantal benodigde dieren per experimentgroep. De volgende formule wordt hiervoor gebruikt: $N = 2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * \sigma^2 / d^2$. Alpha, power en expected difference blijven in dit voorbeeld gelijk. Het verschil in aantal muizen tussen experimenten met alleen vrouwtjes muizen of beide geslachten wordt dus alleen bepaald door de standaarddeviatie. De factor waarmee de groeps grootte toe zal nemen bij gebruik van beide geslachten kan als volgt berekend worden: $\sigma^2_{female+male} / \sigma^2_{female} = 1.52 / 1.22 = 1.6$*

*Als we het gebruik van beide geslachten toepassen op het gehele project dan zal dit leiden tot het gebruik van: $2560 * 1.6 = 4000$ muizen. Om onnodig gebruik van muizen te voorkomen, beperken we ons daarom enkel tot vrouwtjes muizen.*

-Zoals het nu is verwoordt lijkt het alsof de onderzoekers verwachten dat alle mannen in groepshuisvesting gaan vechten waardoor zij enkele weken individueel gehuisvest moeten worden. De commissie verzoekt hen dit genuanceerder op te schrijven (ook in DAP2).

Antwoord: De bewoording is aangepast in zowel DAP1 als DAP2.

-I: De onderzoekers zullen het effect van immuunmodulators onderzoeken (in de tabellen is sprake van adjuvantia). Als er ongerief van adjuvantia en immunomodulators wordt verwacht dan dit graag vermelden (ook in DAP2).

Antwoord: Om verwarring te voorkomen is in het gehele document de term 'immune modulating molecules' vervangen door 'adjuvants'. We verwachten dat het toedienen van adjuvantia niet zal leiden tot een hoger ongerief.

DAP2

-K: Er worden geen middelen gegeven om benauwdheid te verlichten. Kunnen de onderzoekers een humaan eindpunt definiëren waardoor het ernstig ongerief wordt voorkomen?

Antwoord: Er is gekozen om geen middelen toe te dienen om de benauwdheid te voorkomen omdat dit mogelijk effect kan hebben op de infectie en daardoor op de te verkrijgen resultaten. De benauwdheid die kan optreden is een gevolg van ontsteking, wat gepaard gaat met symptomen zoals gewichtsverlies, verslechterde vachtverzorging, gebogen rug, verlaagde lichaamstemperatuur en verminderde mobiliteit. Zodra deze criteria worden waargenomen, zal de desbetreffende muis uit het experiment genomen worden, zoals ook beschreven onder 'J. Humane endpoints'. Ernstig ongerief wordt voorkomen door middel van evaluatie van de temperatuur, gewichtsverlies en gedrag van de muizen. Naar aanleiding hiervan is uit de NTS verwijderd dat <10% van de muizen ernstig ongerief zal ervaren, aangezien dit voorkomen zal worden.

Niet-technische samenvatting:

-3.5: Het percentage dieren dat ernstig ongerief zal ondergaan is niet vermeld.

Antwoord: Er wordt geen ernstig ongerief meer verwacht (zie antwoord op de vorige vraag).

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Het wetenschappelijk belang van dit project is in meer detail toegelicht onder paragraaf 3.1 en 3.2 van de NTS, zoals dit eerder is aangepast in de project proposal.

- 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. 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 is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project'. Het is niet mogelijk om de individuele onderzoeksvragen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel

binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. 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. Voor zover de DEC weet is er geen “tegenstrijdige” wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het ontwikkelen van vaccinatiestrategieën die resulteren in optimale bescherming tegen *Streptococcus pneumoniae* in muismodellen. Het uiteindelijke doel is te komen tot betere bescherming tegen *S. pneumoniae* in de bevolking. De aanvrager zal het effect van verschillende toedieningroutes (mucosaal en parenteraal) en van verschillende vaccinatieprotocollen met ‘deeltjesvaccins’ op lokale en systemische immuniteit onderzoeken bij muizen met behulp van enkele (model) Pneumococcus antigenen. Het is aannemelijk dat de inzichten uit dit onderzoek zullen bijdragen aan de ontwikkeling van effectievere vaccinatiestrategieën voor *S pneumoniae* bij mensen. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project een directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project daaraan zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van effectieve vaccinatiestrategieën met antigenen in deeltjesvorm op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van optimale vaccinatiestrategieën tegen de meerderheid van de circulerende pneumokokken stammen, en dat er behoefte is aan effectievere vaccins die brede bescherming bieden tegen alle serotypen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf 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. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor de bevolking/patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan het voorkomen van ziekte, hetgeen een verbetering van kwaliteit van leven betekent. Gerichte vaccinatie op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere bescherming tegen *S. pneumoniae*. Dit kan er toe leiden dat minder mensen last hebben van ernstige infecties met *S*

pneumoniae. Met name in ontwikkelingslanden zal hierdoor het aantal kinderen dat sterft aan een longontsteking sterk kunnen dalen. Kunnen beschikken over adequate vaccinaties om ernstige ziekten te voorkomen is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

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 huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De meeste proeven worden gedaan met een mild infectiemodel, waarin het ongerief voor de dieren licht is. Om te onderzoeken of de meest veelbelovende vaccinatiestrategieën bescherming bieden tegen longontsteking wordt een model gehanteerd waarin longontsteking ontstaat. Door frequente controles en het zorgvuldig toepassen van humane eindpunten wordt ernstig ongerief voor deze dieren voorkomen, waardoor het ongerief voor de dieren beperkt blijft tot matig.
12. De integriteit van dieren wordt in beperkte mate aangetast door deze experimenten. De challenge experimenten waarin wordt onderzocht of de vaccinatiestrategieën bescherming bieden tegen longontsteking, veroorzaken in de eerste plaats ziekte en ongerief bij een deel van de dieren, maar ook hun gedrag en zelfredzaamheid worden daardoor onvermijdelijk beïnvloed.

13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van eerdere ervaring ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten. De humane eindpunten worden toegepast om ernstig ongerief voor de dieren te vermijden.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderdelen van het project die *in vitro* bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk. Het effect van vaccinatiestrategieën kan niet goed zonder proefdieren onderzocht worden, omdat meerdere organen en celtypen betrokken zijn bij de werking van het immuunsysteem.

15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven of pilots worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Waar mogelijk gebruiken de onderzoekers een mild infectiemodel waarbij de dieren niet ziek worden. Wanneer het effect van vaccinatie op longontsteking wordt bestudeerd, wordt het laatste meetpunt zodanig gekozen dat de dieren nog niet ernstig ziek zijn. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: "In de literatuur zijn sexe-gerelateerde verschillen in vatbaarheid voor infecties met pneumokokken beschreven. Gebruik van beide sexen leidt dus tot grotere spreiding in de resultaten, waardoor er meer dieren nodig zijn om een bepaalde effectgrootte te kunnen aantonen." De aanvrager laat op basis van een realistische aanname over de toename van de spreiding zien, dat het om een zeer groot aantal extra dieren gaat. De onderzoekers geven de voorkeur aan vrouwelijke dieren omdat deze makkelijker in groepen gehouden kunnen worden. Individuele huisvesting van mannelijke dieren die niet in groepen gehouden kunnen worden geeft extra ongerief voor deze dieren. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke of vrouwelijke dieren uit te voeren. Zij is het eens met de keuze voor vrouwelijke dieren.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn

2010/63/EU.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Pneumokokken kunnen ernstige infecties veroorzaken zoals longontsteking, meningitis, bloedvergiftiging en middenoorontsteking. Met name jonge kinderen, ouderen en mensen met verminderde afweer kunnen hier zeer ziek van worden of zelfs overlijden. In ontwikkelingslanden is longontsteking – meestal veroorzaakt door een infectie met pneumokokken - doodsoorzaak nummer één van kinderen onder de vijf jaar. De huidige vaccins tegen deze ziekteverwekker geven geen bescherming tegen alle serotypen, waardoor er steeds een herleving is van pathogene serotypes. De ontwikkeling van een effectief vaccin dat brede bescherming biedt, zal resulteren in minder ziekte en sterfte door pneumokokken. Bovendien zullen de resultaten van dit onderzoek ook gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van vaccins tegen andere ziekteverwekkers. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van effectievere vaccins tegen pneumokokken van substantieel belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van vaccinatiestrategieën die resulteren in optimale bescherming tegen *Streptococcus pneumoniae* in muismodellen. Het uiteindelijke doel daarvan is te komen tot betere bescherming tegen *S. pneumoniae* in de bevolking. De DEC is van mening dat de belangen van de bevolking/patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

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 is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017904
Bijlagen
1

Datum 13 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection" met aanvraagnummer AVD103002017904. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 maart en 12 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de go/no-go momenten van uw project beschreven en de Niet-technische samenvatting tekstueel aangepast.

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 10a1, lid 2, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection" starten. De vergunning wordt afgegeven van 13 april 2017 tot en met 12 april 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC 2016-0105 gevoegd. Dit advies is opgesteld op 10 maart 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:
13 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017904

Bezwaar

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 april 2017 tot en met 12 april 2022, voor het project "Combining parenteral and mucosal vaccination strategies against pneumococcal infection" met aanvraagnummer AVD103002017904, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC 2016-0105. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 10 maart 2017, ontvangen op 13 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 maart en 12 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Vaccination-colonization model				
	Muizen (Mus musculus) /	2.160	100% Licht	
3.4.4.2 Vaccination-pneumonia model				
	Muizen (Mus musculus) /	400	100% Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:

AVD103002017904

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:
AVD103002017904

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:

AVD103002017904

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-09									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017924								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4 oud				x		x	x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
11	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
12	Projectvoorstel nieuw				x		x	x	
13	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw				x		x	x	
14	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw				x		x	x	
15	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw				x		x	x	
16	Bijlage beschrijving dierproeven 4 nieuw				x		x	x	
17	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
18	Advies CCD		x						x
19	Beschikking en vergunning				x		x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>50169181</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	50169181									
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	50169181																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="0"><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg</td><td>4-6</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD</td><td>Maastricht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td><td></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td><td></td></tr></table>	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6	Postbus	616		Postcode en plaats	6200 MD	Maastricht	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6															
Postbus	616																
Postcode en plaats	6200 MD	Maastricht															
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(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.	<table border="0"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

- 1.6 (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 - 4 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 4 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Rol van nieuwe genen in de ontwikkeling van hartfalen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---------------------------------|
| Naam DEC | DEC-UM |
| Postadres | Postbus 616, 6200 MD Maastricht |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 2013 Lege
 Wijziging € Lege

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

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

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	Maastricht
Datum	13 - 3 - 2017
Handtekening	[Redacted]



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.
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.

Metabool hartfalen, een complex ziektebeeld

Metabool hartfalen

Hartfalen met een behouden ejectie fractie, ook wel HFpEF en metabool hartfalen genoemd, is een groeiend klinisch en maatschappelijk probleem dat voortvloeit uit de risicofactoren horend bij een moderne levensstijl, samenvattend het metabole syndroom. Een kwart van de wereldpopulatie lijdt aan het metabole syndroom, waarbij de meerderheid een combinatie heeft van type 2 diabetes, obesitas en hypertensie, ook wel "diabetesotensie" genoemd (Sharabi 2012). De 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan de morbiditeit en mortaliteit van het metabole syndroom zijn 1) **microvasculaire (endotheel) dysfunctie**, 2) **ontsteking**, 3) **cardiomyocyt hypertrofie**, 4) **metabole veranderingen in cardiomyocyten en ontstekingscellen** ten gevolge van o.m. insuline resistentie en hypertensie, en eindorgaanschade met 5) **bindweefselafzetting/fibrose** in bijvoorbeeld het hart (Aroor 2013, Schroen 2012). Deze 5 pathofysiologische processen leiden uiteindelijk tot hartfalen, waarbij er hoofdzakelijk hartfalen met behouden ejectiefractie (HFpEF) ofwel "metabool hartfalen" wordt gezien (Paulus 2013). Een van de belangrijkste kenmerken van HFpEF is diastolische dysfunctie, oftewel een stijf hart dat moeilijk ontspant (Paulus 2013).

Immuunsysteem

In welke mate het immuunsysteem en externe pathogenen bijdragen aan hartfalen al dan niet in combinatie met bovenstaande risicofactoren is nog onbekend. [REDACTED]

Ook is de overleving en hartfunctiebehoud na een myocardinfarct steeds beter door betere en snellere behandelingen. Echter, de 5 pathofysiologische processen van HFpEF spelen in het hart na het overleven van een myocardinfarct ook een centrale rol, en ook hier is het onbekend wat de interactie is tussen het geactiveerde immuunsysteem na een myocardinfarct en de aanwezigheid van diabetesotensie. Zowel de infectie met relatief onschuldige virussen als het overleven van een myocardinfarct kunnen als additionele risicofactoren voor hartfalen worden beschouwd, waarbij immunosuppressie mogelijk een belangrijke rol speelt.

Helaas kan de cardioloog een patiënt met HFpEF – in tegenstelling tot iemand met hartfalen met verlaagde ejectiefractie – geen effectief geneesmiddel aanbieden, waardoor de levenskwaliteit van HFpEF patiënten sterk verlaagd wordt en de mortaliteit wereldwijd exponentieel toeneemt met de groeiende obese en oudere populatie (Nanayakkara S 2015, Horgan 2014). Om een betere behandeling van HFpEF mogelijk te maken is er kennis nodig van de onderliggende pathofysiologische en moleculaire processen, waaronder de (relatieve) bijdragen en interacties van bovengenoemde 5 processen in de diverse organen en systemen die aangedaan zijn tijdens het metabole syndroom, zoals hart, lever, nieren, longen, het zenuwstelsel, het vetweefsel, de pancreas en de skeletspieren.

Huidige stand van zaken

Het is bekend dat de 5 pathofysiologische processen die hierboven beschreven staan, allen bijdragen aan de ontwikkeling van HFpEF. Echter, de (combinatie van) risicofactoren die bijdragen aan de ziekte verschillen per patiënt. Het falen van de vele klinische trials waarbij HFpEF als 1 ziekte werd beschouwd (Nanayakkara 2015), onderstreept het belang van patiënten stratificatie om te komen tot effectieve behandelwijzen met "therapie-op-maat". De cardioloog heeft te maken met 2 problemen: 1) wat is de impact van de diverse risicofactoren en hiermee gepaard gaande pathofysiologische processen op het ziekteverloop in HFpEF patiënten?, en 2) welke therapie-op-maat kan worden aangeboden? Er is grote behoefte aan nieuwe therapeutische targets, die er alleen kunnen komen als er meer inzicht komt in de onderliggende mechanismen (Nanayakkara 2015). Dit project heeft als doel meer inzicht te verkrijgen in de moleculaire processen betrokken bij de pathofysiologische mechanismen van HFpEF en daarmee nieuwe therapeutische targets te identificeren. Onze groep maakt zich daarnaast sterk om de HFpEF patiëntenpopulatie te helpen stratificeren in samenwerking met cardiologen, radiologen en fysiologen.

Schematisch

Diabetesotensie/ metabool syndroom ± immunosuppressie >>> pathofysiologische mechanismen (in

willekeurige volgorde: cardiale microvasculaire dysfunctie, ontsteking, cardiomyocyt hypertrofie, metabole veranderingen in cardiomyocyten en ontstekingscellen, en bindweefselvorming) >>> HFpEF/metabool hartfalen

Niet-coderende RNA moleculen spelen belangrijke rollen in pathofysiologische processen

De helft van het zoogdierengenoom bestaat uit niet-eiwit-coderende genen. De hieruit voortkomende niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs" (lncRNAs), spelen een rol in alle (patho)biologische processen, ook in processen die leiden tot hartfalen

Echter, de rol van niet-coderende RNA moleculen, in de 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan HFpEF is grotendeels onbekend. Om te komen tot nieuwe inzichten in de moleculaire processen betrokken bij de pathofysiologische mechanismen van HFpEF en de identificatie van nieuwe therapeutische targets, zal dit project zich daarom richten op de rol van niet-coderende RNA moleculen.

Translationeel potentieel:

Niet-coderende RNA moleculen vormen een even grote groep genen als de eiwit-coderende genen. Niet-coderende RNA moleculen zijn relatief makkelijk te remmen met specifieke medicijnen (bv "antagomirs"), waarvoor de eerste klinische trials al lopen. Het feit in aanmerking nemend dat voor de grote en groeiende groep HFpEF patiënten nog geen therapie beschikbaar is, biedt het exploreren van de rol en mogelijkheden van deze grote groep genen een ongekend therapeutisch potentieel.

Relevante referenties:

- Sharabi Y. Management of the unholy trinity diabetes-obesity-hypertension (diabesotension). Diabetes/metabolism research and reviews 2012
- Aroor AR, McKarns S, Demarco VG, Jia G, Sowers JR. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. Metabolism: clinical and experimental. 2013;62:1543-1552
- Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. J Am Coll Cardiol. 2013;62:263-271
- Nanayakkara S, Kaye DM. Management of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Review. Clin Ther. 2015 Oct 1;37(10):2186-98.
- Horgan S et al. Murine Models of Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. Journal of Cardiac Failure. 2014 Dec;20(12):984-95
- Patel BM, Mehta AA. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. European journal of pharmacology. 2012;697:1-12

Samenhang tussen hypothesen a-d

De 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen, en die worden aangeschakeld door de risicofactoren horend bij het metabole syndroom, beïnvloeden elkaar. Microvasculaire dysfunctie en ontsteking hebben een wisselwerking op elkaar; het door het metabole syndroom geactiveerde endotheel trekt ontstekingscellen aan, en op zijn beurt verhoogt ontsteking de permeabiliteit van de vaten. Tegelijkertijd verlaagt microvasculaire dysfunctie de toevoer van voedingsstoffen en zuurstof naar de cardiomyocyt, leidend tot cardiomyocyt dysfunctie. Cardiomyocyt dysfunctie en ontsteking worden verergerd door verhoogde activatie van het renine-angiotensine-aldosteron systeem en het veranderde aanbod van circulerende suikers en vetzuren tijdens diabetes, en leiden tot apoptose van diverse celtypen en bindweefselvorming.

De **haalbaarheid** van het project wordt ondersteund door:

- a. De beschikbaarheid van diverse cel- en muizenmodellen van hartfalen binnen het instituut.
- b. De toegang tot fenotyperingsapparatuur en -expertise binnen het instituut, alsook de gevestigde moleculaire infrastructuur.
- c. De moleculaire en pathofysiologische achtergrond van de PI [REDACTED]

De beschikking over subsidiegelden van de PI die aan het doel van dit project besteed dienen te worden, en de expertise van de PI met diermodellen.

3.3 Belang

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

Hartfalen is een progressieve en ernstig invaliderende aandoening met een slechte prognose waarvoor geen therapie beschikbaar is anders dan symptoombestrijding. Volgens statistieken van de Nederlandse Hartstichting en het RIVM leven er in Nederland zo'n 200.000 mensen met hartfalen, waarvan de helft HFpEF heeft. De helft van de patiënten overlijdt binnen 5 jaar na diagnose, waarbij er voor de HFpEF populatie geen effectieve behandeling voorhanden is. Risicofactoren voor de ontwikkeling van HFpEF zijn hoge bloeddruk, (pre-)diabetes en obesitas. Veel patiënten hebben een combinatie van deze risicofactoren (diabetes), maar zelden worden de risicofactoren tezamen bestudeerd. Tevens is over de progressie van prediabetes naar vergevorderd diabetes niet veel bekend, daarom worden modellen bestudeerd. Deze fundamentele en translationele studie zal bijdragen aan de opheldering van de mechanismen die leiden tot HFpEF, door de combinatie van hoge bloeddruk, (pre-)diabetes en obesitas als uitgangspunt te nemen, en de rol van niet-coderende RNA moleculen te bestuderen die in deze condities geïmpliceerd zijn. Op termijn hopen we met de vergaarde kennis te helpen voorkomen dat mensen hartfalen ontwikkelen danwel hieraan overlijden. Dit is zowel sociaal als economisch van grote maatschappelijke relevantie.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

1) Kandidaatgenen

Uit diverse reeds gecompleteerde screens voor identificatie van niet-coderende RNA moleculen betrokken bij processen die hartfalen beïnvloeden, zijn kandidaat moleculen voor *in vivo* bestudering geselecteerd:

- *in vitro* screen van 194 microRNAs, waarbij deze tot overexpressie zijn gebracht in cardiomyocyten, bindweefselcellen en ontstekingscellen [REDACTED] De readouts

van de respons van de cellen op de verhoogde expressie van de microRNAs zijn gerelateerd aan aspecten van de ontwikkeling van hartfalen, respectievelijk celgroei, bindweefselvorming en ontstekingsrespons.

- Microarray resultaten van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in humane hartbiopten van mensen met hartfalen (waaronder HFpEF (ongepubliceerd) en viraal hartfalen [redacted] en gezondere controles.
- Deep sequencing resultaten (ongepubliceerd) die expressie tonen van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in een ratten model van HFpEF.
- Microarray resultaten van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in muizenmodellen van hartfalen (TAC, Angiotensine II en viraal hartfalen, zie bijvoorbeeld [redacted])

We beschikken op dit moment over een lijst van **60 kandidaatgenen** die afkomstig zijn uit deze bestaande datasets. Voor deze eerste stap van het onderzoek zijn derhalve geen dierproeven nodig. Deze 60 kandidaatgenen zullen in stap 2) *in vitro* gevalideerd worden.

2) Validatie in historische samples en in *in vitro* modellen

Geselecteerde niet-coderende RNA kandidaten zullen **gevalideerd** worden in

- a) reeds verzamelde monsters van muizenharten, rattenharten en humane hartbiopten middels
 - a. expressie-analyses
 - b. geoptimaliseerde histologische en *in vitro* technieken (zie bvb [redacted] ter bepaling van de bron van expressie (celtype)
Voor deze stap wordt gebruik gemaakt van historische monsters en zijn geen proefdieren nodig.
- b) de geïdentificeerde cellen van oorsprong ter bepaling van de moleculaire processen waarbij deze kandidaten betrokken zijn. Hiertoe worden cellen geïsoleerd uit proefdieren.

De te bestuderen moleculaire processen betrokken bij de ontwikkeling van hartfalen/HFpEF en gerelateerd aan de 5 beschreven pathofysiologische processen zijn:

1. hypertrofie van cardiomyocyten
2. cardiomyocyt metabolisme
3. endotheelcel proliferatie en functie
4. ontstekingsparameters in elk cardiaal celtype, met name cardiomyocyten, endotheel- en ontstekingscellen
5. bindweefselvorming door fibroblasten

De bron van de te gebruiken cellen is deels cellijnen (cardiomyocyten, endotheelcellen, fibroblasten, ontstekingscellen), maar gezien de grote gevolgen van immortalisatie van deze cellen op hun metabolisme en groei in deze cellen (zie bvb Monge et al. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Apr;87(4):318-26. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes) – processen die tijdens hartfalen een primaire rol spelen - is het van belang de processen ook in de volgende primaire cellen te bestuderen:

- Neonatale rat cardiomyocyten > bestudering van celgroei (oorsprong: wild type)
- Adulte rat cardiomyocyten > bestudering van metabolisme (oorsprong: wild type op controle dieet of hoog vet dieet)
- Neonatale rat cardiale fibroblast > bestudering van bindweefselvorming (oorsprong: wild type)
- Beenmergcellen geïsoleerd uit de muis die *in vitro* worden gedifferentieerd tot macrofaag > bestudering van ontstekingsrespons (oorsprong: wild type en transgene muizen)

NB. Het gebruik van neonatale cellen voor de bestudering van "volwassen" hartfalen processen heeft voor- en nadelen. Voordeel is dat hartfalen in feite deels een herprogrammering van cardiomyocyten is richting neonatale genexpressie, wat dit model zeer representatief maakt. Aan de andere kant zijn deze cellen nooit volwassen geweest, dus ondergaan geen herprogrammering. Neonatale hartspiercellen zijn door hun relatieve toegankelijkheid (gemak van isolatie) en gemak om mee te kweken het meest gebruikte en geaccepteerde *in vitro* model

van hypertrofie en hartfalen (Louch et al. J Mol Cell Cardiol. 2011 Sep; 51(3): 288–298).

We schatten in zo'n **20 kandidaatgenen** te kiezen naar aanleiding van resultaten uit bovenstaande *in vitro* experimenten, om deze in stap 3) *in vivo* te bestuderen. Dit aantal is een schatting gebaseerd op 1) ervaring met het valideren van grootschalige genexpressie data, die in de praktijk in $\pm 70\%$ van de genen worden bevestigd, 2) het daarop volgende uitgebreide literatuuronderzoek om uit te sluiten dat de rol van een kandidaatgen al door andere onderzoekers wordt onderzocht, en 3) onze ervaring met het pre-valideren van de functies van kandidaatgenen middels *in vitro* celexperimenten, waaruit blijkt dat een klein deel van de kandidaatgenen geen actieve rol spelen in hartfalen processen.

3) Onderzoek in diermodellen

Voor kandidaatgenen die de validatiestap hebben doorstaan zal de rol, waaronder de causale betrokkenheid, in de in punt 3.4.2 voorgestelde **dierenmodellen** van metabool syndroom en hartfalen worden onderzocht. In deze dierenmodellen zullen niet-coderende RNA moleculen gemanipuleerd worden middels remmende oligo's (antimiRs voor microRNAs en gapmers voor long non-coding RNAs), overexpressie met behulp van virale vectoren of mimics of door gebruik van transgene modellen (bvb [REDACTED]). De dierenmodellen zullen in punt 3.4.2 in meer detail worden beschreven. Het besluit voor het soort diermodel wordt genomen o.b.v. de directe betrokkenheid van het kandidaatgen bij minimaal een van de 5 pathofysiologische processen, zoals beschreven in 3.4.3 (zie ook schematische weergave van de keuzemomenten bij punt 3.4.3). Bij een multifactoriële aandoening als HFpEF is het bijvoorbeeld mogelijk dat een kandidaatgen direct 1 pathofysiologisch proces beïnvloedt en indirect (meerdere) andere.

4) Valorisatie

De resultaten zullen in internationale peer-reviewed wetenschappelijke tijdschriften worden gepubliceerd. Er zal bekeken worden hoe de data in een patent verwerkt kunnen worden. Omdat de geselecteerde targets obv hun expressiepatroon ook een rol lijken te spelen in humaan hartfalen, kan snel de stap worden gezet richting klinische translatie, waarbij de korte lijnen met de kliniek aangesproken zullen worden. In samenwerking met partners van de farmaceutische industrie zullen therapeutische targets in een groter proefdiermodel van hartfalen worden onderzocht, als eerste stap richting klinische toepassing.

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

Onderstaande dierenmodellen (**Tabel 1**) zijn gekozen obv hun relevantie voor het bestuderen van hartfalen ten gevolge van het metabole syndroom of de individuele componenten vallend onder het metabole syndroom; diabetes, obesitas, hypertensie en virale aanwezigheid (Horgan 2014; [REDACTED]). Elk diermodel zal een bijdrage leveren aan het begrip van de onderliggende pathofysiologische mechanismen die tot hartfalen/HFpEF leiden, dus cardiomyocyt dysfunctie, cardiale microvasculaire dysfunctie, ontsteking, insuline resistentie en bindweefselvorming. De 20 niet-coderende RNA moleculen die in dierenmodellen zullen worden onderzocht voor hun causale bijdrage aan HFpEF zullen in 1 of meerdere (maximaal 5) van onderstaande dierenmodellen worden bestudeerd. Literatuur ondersteunt het combineren van verschillende dierenmodellen om te komen tot zinvolle translationele bevindingen (Horgan 2014). De keuze van het diermodel wordt bepaald door de resultaten van de *in vitro* studies uit stap 2 van de beschreven strategie (3.4.1). Omdat NSAID's en opioïden interfereren met ontsteking, zal in geval dat ontsteking een primaire uitkomstmaat is, afgeweken worden van de GV SOLAS richtlijnen voor pijnbestrijding en geen analgesie toegepast worden. In dat geval worden de humane eindpunten nog scherper omlijnd.

Tabel 1. [REDACTED]

[REDACTED]



* hoog vet dieet veroorzaakt pre-diabetes.

**Hoewel TAC een acuut model van drukoverbelasting is, in tegenstelling tot een meer progressief verloop in mensen, reproduceert het model meerdere pathofysiologische processen die ook in de mens plaatsvinden, inclusief hypertrofie en diastolische dysfunctie (Monnet et al. Ann Thorac Surg 2005; Horgan et al. Journal of Cardiac Failure 2014; Respress et al. Circ Res 2012).

***Phenylephrine wordt gebruikt als model voor acute drukoverbelasting, voor het aanschakelen van immediate early genes en signaleringspaden in cardiomyocyten (Bueno et al. Circ Res 2001;88:88-96).

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.

Algemene doelstelling

De algemene doelstelling van het project is nieuwe therapeutische targets te vinden voor de behandeling van HFpEF. Als strategie is gekozen allereerst kandidaatgenen die uit bestaande datasets komen te manipuleren in relevante celmodellen *in vitro*. Op basis van de rol die dan gevonden wordt voor een bepaald kandidaatgen, wordt een keuze gemaakt voor het *in vivo* muizenmodel: AngII infusie of TAC, eventueel in combinatie met hoog vet dieet (als de kandidaat ook een rol heeft in metabolisme), of CVB3 infectie. Als uit een eerste *in vivo* experiment blijkt dat het kandidaatgen een rol heeft in pre-diabetes (AngII/TAC en hoog vet dieet), wordt een tweede *in vivo* experiment uitgevoerd met een ander muizenmodel van diabetes tensie dat een meer gevorderd stadium van diabetes onderzoekt: diabete $db^{-/-}$ muizen in combinatie met drukoverbelasting door AngII infusie of TAC.

Samenhang tussen onderdelen

De samenhang tussen de beschreven dierproeven wordt bepaald door de samenhang tussen de 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan hartfalen. Deze 5 processen vinden altijd in combinatie met elkaar plaats tijdens de ontwikkeling van hartfalen. Echter, hun individuele bijdrage

verschilt afhankelijk van de betrokken risicofactoren. Bijvoorbeeld, bij enkel hypertensie als onderlegger zijn er relatief minder metabole veranderingen in het hart, en bij enkel diabetes of obesitas is er relatief minder cardiomyocyt hypertrofie en bindweefselvorming in het hart. In aanwezigheid van een virus of na een myocardinfarct zal de ontstekingsrespons het sterkst zijn. Het manipuleren van kandidaatgenen die op 1 of meer van de 5 processen aangrijpen, maakt het mogelijk de mate van causale betrokkenheid bij hartfalen van deze processen in kaart te brengen, en maakt het tegelijkertijd mogelijk om nieuwe therapeutische targets te identificeren. Om die reden zal voor elk kandidaatgen eerst de betrokkenheid bij de 5 processen in kaart worden gebracht middels *in vitro* experimenten die de 5 processen artificieel uit elkaar trekken, en vervolgens zal op basis van de resultaten een *in vivo* model gekozen worden dat de gevonden betrokken processen het best representeert (**Tabel 2**).

Tabel 2.

Keuzemomenten en go/no-go momenten:

- 1) Validatie van de expressie van kandidaatgenen in historische samples: van 60 naar 20 kandidaatgenen. Van deze 20 gekozen kandidaatgenen worden in deze stap het celtype/bron van expressie bepaald, zodat *in vitro* validatie experimenten in stap 2 gericht op relevante celtypen kunnen worden opgezet.
In deze eerste stap, die enkel gebruik maakt van historische samples, komen we dus tot 20 kandidaatgenen voor bestudering in nieuwe proefdierexperimenten.

- 2) validatie in *in vitro* modellen middels manipulatie van de individuele kandidaatgenen in hun celtype van oorsprong: wordt er een rol gevonden van het kandidaatgen in cellulaire readouts van een van de 5 pathofysiologische processen betrokken bij hartfalen? Hierbij wordt gebruik gemaakt van zowel cellen uit neonatale dieren, die met name celgroei reflecteren, als cellen uit adulte dieren, die celmetabolisme en productie van bvb bindweefsel reflecteren.

- *Go/no-go moment:* -

Ja > verfijning van hypothese en verder met stap 3.

- Kandidaatgenen die een rol hebben in cardiomyocyt en/of microvasculaire dysfunctie zullen in stap 3 worden onderzocht in een muismodel van drukoverbelasting, cardiomyocyt en microvasculaire dysfunctie door TAC, al dan niet in combinatie met hoog vet dieet.
- Kandidaatgenen die een rol hebben in fibrose en/of ontsteking zullen in stap 3 worden onderzocht in muismodellen van drukoverbelasting, fibrose en ontsteking door AngII, al dan niet in combi met hoog vet dieet.

Nee > stop.

- 3) validatie in *in vivo* model: heeft het kandidaatgen een rol in hartfalen? Hiertoe zal het

kandidaatgen in een diermodel van hartfalen worden gemanipuleerd, al dan niet in combinatie met hoog vet dieet. Keuze van diermodel(len) wordt bepaald door de verfijnde hypothese uit stap 2. Wordt er een rol gevonden van het kandidaatgen in de ontwikkeling van hartfalen/HFpEF?

- *Go/no-go moment*: -

Ja > verfijning van de hypothese en nieuw dierexperiment met andere oorzaak leidend tot hartfalen. De verwachting is dat de meeste kandidaatgenen (16 van de 20) een rol blijken te hebben in hartfalen; uit onze ervaring blijkt dat de *in vitro* validatie stap een optimale keuze van kandidaatgenen mogelijk maakt.

Nee > stop.

- 4) Tweede validatiestap in *in vivo* model(len): heeft het kandidaatgen een rol in een ander model van hartfalen, en welke? In deze stap zullen we de rol van het kandidaatgen in een ander model van hartfalen bepalen, alsook inzoomen op het celtypen waarin het kandidaatgen een rol speelt, en de vroege kandidaatgen-afhankelijke processen die betrokken zijn tijdens de ontwikkeling van hartfalen.
- 5) Valorisatie: plannen van vervolgstappen om kandidaatgen richting therapeutische toepassing te sturen. Hieronder vallen patentering, samenwerking opstarten met farmaceutische industrie voor financiering van experimenten in grotere proefdieren, publicatie, en uiteindelijk klinische trials.

Voorbeeld 1: uit stap 1) komt dat het kandidaatgen hoog tot expressie komt in hypertrofe harten en in historische cardiomyocytmonsters. In stap 2) zullen daarom neonatale rat cardiomyocyten gebruikt worden voor het bestuderen van celgroei responsen na manipulatie van het molecuul, en adulte rat cardiomyocyten voor het bepalen van metabole effecten na manipulatie van het kandidaatgen. Er zal gebruik worden gemaakt van adulte ratten die op een controle dieet hebben gestaan, of die zijn blootgesteld aan een hoog vet dieet.

Uit stap 2) komt dat het molecuul een rol heeft in cardiomyocyt metabolisme. Daarom zal in stap 3) het molecuul worden gemanipuleerd in een pre-diabetes model van muizen met hoogvetdieet en drukoverbelasting door TAC. Aan het einde van het experiment zal de hartfunctie van het dier in kaart worden gebracht (een van de twee primaire uitkomstparameters, naast cardiomyocyt dysfunctie), waarna het geexplanteerde hart onderworpen wordt aan uitgebreide moleculaire, cellulaire en histologische analyses die voor muis zijn opgezet en een beeld zullen geven van de moleculaire processen waarin het kandidaatmolecuul een rol heeft.

Als er een rol gevonden wordt voor het kandidaatgen in hartfalen, zal het kandidaatgen vervolgens in stap 4) op maximaal 4 manieren worden onderzocht: a) manipulatie in een tweede muizenmodel van diabetesotensie, namelijk in drukoverbelaste $db^{-/-}$ muizen; b) herhaling van TAC met hoogvetdieet voor het isoleren van cellen uit het hart (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken); c) korterdurend experiment met TAC en hoogvetdieet voor het bepalen van celresponsen (vroege cellulaire en moleculaire processen inclusief cardiomyocyt hypertrofie, cardiomyocyt metabolisme, ontstekingsrespons, endotheeldysfunctie) voorafgaand aan hartfalen; en d) acute PE injectie voor het bepalen van de "immediate early" responsen in het hart (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken).

Voorbeeld 2: uit stap 1) komt dat het kandidaatgen hoog tot expressie komt in virale myocarditis en in historische beenmergmicrofaag monsters. In stap 2) zullen daarom beenmergcellen gebruikt worden voor het bestuderen van inflammatoire responsen na manipulatie van het kandidaatgen.

Uit stap 2) komt dat het kandidaatgen een rol heeft in macrofagen. [REDACTED]

[REDACTED] Daarom zal in stap 3) het gen worden gemanipuleerd in een model van drukoverbelasting door Angiotensine II met als primaire uitkomstparameter hartfunctie. Als er een rol wordt gevonden voor het kandidaatgen in hartfalen, zal het vervolgens in stap 4) op maximaal 5 manieren worden onderzocht: a) manipulatie in een tweede muizenmodel van diabetesotensie, namelijk in drukoverbelaste $db^{-/-}$ muizen; b) herhaling van het eerdere AngII experiment voor het

isoleren van cellen uit het hart (een manier om de andere primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken); c) korterdurend experiment met AngII voor het bepalen van celresponsen (vroeg cellulaire en moleculaire processen inclusief cardiomyocyt hypertrofie, cardiomyocyt metabolisme, ontstekingsrespons, endotheeldysfunctie) voorafgaand aan hartfalen; d) virale myocarditis door CVB3 infectie met hoogvetdieet voor de bestudering van de ontstekingsrespons onder pathogene en metabole condities (een manier om de andere primaire uitkomstparameter, ontsteking, te onderzoeken); en e) myocardinfarct met hoogvetdieet voor de bestudering van de ontstekingsrespons onder steriele pro-inflammatoire en metabole condities (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, ontsteking, te onderzoeken).

Keuzemomenten schematisch (besluitmodel):



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

Volgnummer	Type dierproef
1	Isolatie van neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten en adulte rat cardiale myocyten
2	Isolatie van beenmergcellen uit muizen
3	Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen
4	Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene $db^{-/-}$ muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen

5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Rol van nieuwe genen in de ontwikkeling van hartfalen
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Overgewicht, suikerziekte, hart- en vaatziekten, ontsteking, nieuwe genen

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Overgewicht, suikerziekte en hoge bloeddruk komen vaak gelijktijdig voor, dit wordt ook wel “metabool syndroom” genoemd. Mensen met het metabole syndroom krijgen vaak hartfalen. Met de groeiende populatie ouderen, en de toename van het metabool syndroom bij deze groep, zal het aantal patiënten met hartfalen exponentieel stijgen.</p> <p>Hoewel hartfalen ten gevolge van een hartinfarct redelijk goed te behandelen is, kan de cardioloog patiënten met hartfalen ten gevolge van het metabole syndroom geen therapie bieden. Om die reden is er fundamenteel wetenschappelijk onderzoek nodig naar nieuwe therapieën. Het doel van het huidige onderzoek is de rol van nieuwe genen, hierna “kandidaatgenen”</p>
---	---

	genoemd, te onderzoeken in diermodellen van hartfalen ten gevolge van het metabole syndroom om zo de processen die hartfalen veroorzaken bij deze patiënten te ontrafelen.
3.2	<p>Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?</p> <p>Wetenschappelijk belang: Verkrijgen van nieuwe fundamentele inzichten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen.</p> <p>Maatschappelijk belang: Hartfalen is invaliderend voor de patiënt, belastend voor de familie, en gaat gepaard met hoge kosten voor gezondheidszorg en maatschappij. Met dit onderzoek kunnen nieuwe strategieën voor therapie bij hartfalen ontwikkeld worden, zodat deze patiënten beter behandeld kunnen worden en de negatieve aspecten worden verminderd.</p>
3.3	<p>Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?</p> <p>-192 moederratten -1920 pasgeboren ratten -720 volwassen ratten -18848 muizen</p>
3.4	<p>Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?</p> <p>De dieren zullen hartfalen ontwikkelen, soms in combinatie met overgewicht en suikerziekte. Het leven met deze aandoeningen is beperkend. Dieren kunnen last hebben van kortademigheid, futloosheid en een verminderde fysieke gezondheid.</p>
3.5	<p>Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?</p> <p>Ratten: 2832 (100%) 1. terminaal experiment (geen handelingen): 1920 rattenpups, 600 volwassen ratten (89%) 2. ongerief is licht: 312 volwassen ratten (11%)</p> <p>Muizen: totaal 18848 (100%) 1. terminaal experiment (geen handelingen): 288 (2%) 3. ongerief is matig: 17920 (95%) 4. ongerief is ernstig: 640 (3%)</p>
3.6	<p>Wat is de bestemming van de dieren na afloop?</p> <p>Er wordt euthanasie gepleegd, waarna de organen uitgebreid geanalyseerd zullen worden. Uitzondering: voor moederdieren wordt waar mogelijk een nieuwe bestemming gevonden.</p>

4 Drie V's

4.1	<p>Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p> <p>Voordat een dierproef wordt uitgevoerd, toetsen we eerst de hypothese van betrokkenheid van kandidaatgenen bij hartfalen in weefsels van eerdere dierstudies, in cellijnen en in humane weefsels verkregen tijdens operaties. Als de hypothese standhoudt, zal een dierstudie gestart worden om vast te stellen of het kandidaatgen hartfalen veroorzaakt of ertegen beschermt. Dierstudies blijven nodig zolang er geen alternatieven bestaan die de complexe processen kunnen nabootsen die plaatsvinden bij patiënten met het metabole syndroom en bij de ontwikkeling van cardiovasculaire ziekte.</p>
-----	--

4.2 **Vermindering**

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

Onze jarenlange ervaring in het zoeken naar processen die ten grondslag liggen aan hartfalen maakt het mogelijk goed onderbouwde statistische berekeningen te doen, waardoor het gebruikte aantal proefdieren zo klein mogelijk is. De proeven worden volgens een stappenplan uitgevoerd:

1. Bepaling van rol van kandidaatgenen in hartcellen van rat of muis, die soms een hoog vet dieet gevoerd krijgen gedurende een aantal weken. Het ongerief is licht voor 11% van de ratten (312 ratten). Voor 89% van de ratten (2520 ratten) en 2 % van de muizen (288 muizen) gaat het om terminale experimenten zonder handelingen.
2. Kandidaatgenen, waarvoor in stap 1 een rol gevonden is in processen die bijdragen aan hartfalen, worden onderzocht in een muismodel van hartfalen. Het ongerief is matig (17% van de muizen (3200 muizen) worden in deze stap onderzocht).
3. Bij bevestiging van de hypothese, wordt de rol van het kandidaatgen bepaald in andere muismodellen van hartfalen en op andere momenten tijdens de ontwikkeling van hartfalen. Het ongerief is matig (78% van de muizen; 14720 muizen) tot ernstig (3% van de muizen; 640 muizen).

In totaal ondervindt 95% van de muizen (17920 muizen) in stappen 2 en 3 matig ongerief, en 3% (640 muizen) ernstig ongerief.

4.3 **Verfijning**

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

De muis en rat ontwikkelen hartfalen op een manier die vertaalbaar is naar de mens. De bestudering van specifieke kandidaatgenen is alleen mogelijk bij deze knaagdieren.

Onze jarenlange ervaring met het onderzoeken van oorzaken van hartfalen in dierstudies maakt, naast het beperken van de aantallen, het ongerief zo gering mogelijk.

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

De dieren krijgen altijd adequate pijnstilling en verdoving, en worden dagelijks gecontroleerd op welzijn. De experimenten worden uitgevoerd door bevoegd en competent personeel.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Isolatie van neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten en adulte rat cardiale myocyten

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Er zal gebruik worden gemaakt van neonatale (0-3 dagen oud) ratten, deze zullen direct voor de isolatie worden opgeofferd. Hiervoor zullen drachtige moeder ratten extern worden besteld. Voor de moederdieren zal na het werpen een ander doel worden gezocht. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncorporeerd.

Volwassen rat cardiale myocyten

Er zal gebruik worden gemaakt van wild type ratten, eventueel in combinatie met hoog vet dieet. Deze zullen direct voor de isolatie op humane wijze worden opgeofferd. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncorporeerd. De keuze voor volwassen dieren wordt gemaakt op het moment dat een kandidaat molecuul een rol heeft in het metabolisme van de cardiomyocyt, omdat 1) deze uitleesparameter in cellijnen en in neonatale cellen niet of beperkt te meten is, en 2) een volwassen dier langere tijd blootgesteld kan worden aan metabole parameters in de circulatie, zoals een hoog vet dieet. Een hoog vet dieet induceert een pre-diabetische status in ratten en dit maakt het mogelijk om de chronische effecten van verhoogd circulerend insuline, glucose en vetzuren op cardiomyocyt metabolisme 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.

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

De neonatale dieren worden direct voor de isolatie opgeofferd. Voor de moederdieren zal na het werpen een ander doel worden gezocht. De dieren ondergaan geen behandelingen.

Volwassen rat cardiale myocyten

Volwassen ratten ondergaan ofwel geen behandeling, of ze krijgen een hoog vet dieet gedurende maximaal 24 weken, of een gematcht synthetisch controle dieet, een "normaal vet dieet". De dieren worden direct voor de celisolatie op humane wijze opgeofferd.

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

In ons lab en binnen het onderzoeksinstituut CARIM hebben we reeds een ruime ervaring met isoleren van primaire harspieren en met het gebruik van deze cellen voor experimenten (zie bijvoorbeeld ██████████

██████████ Statistiek is moeilijk toepasbaar op dit soort experimenten met kleine groepsgrootten; onze ervaring is dat 4 biologische replicaten per groep een goed beeld geeft.

B. De dieren

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

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Er zal gebruik worden gemaakt van neonatale (0-3 dagen oud) rattenpups. Hiervoor zullen drachtige moeder ratten worden besteld.

Ter bestudering van een kandidaat niet-coderend RNA molecuul bekijken we effecten op 3 experimentele readouts: genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie, respectievelijk, waarvoor om technische redenen verschillende monsters nodig zijn. Er zijn telkens 4 experimentele condities (controle ongestimuleerd, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie ongestimuleerd en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd). Per experimentele conditie zijn er 4 replicaten met 1 miljoen cellen per replicaat. Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom 3 (experimentele readouts) maal 4 (experimentele condities) maal 4 (replicaten) = 48 miljoen cellen nodig. Voor de validering van 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen hebben we daarom 60x48 miljoen cellen = maximaal 2.880 miljoen cellen nodig. Een optimale isolatie resulteert in 1.5 miljoen cellen per dier. Gebaseerd op bovenstaande berekening vragen wij toestemming voor het gebruik van **1920 dieren**. Voor de moederdieren gaan we uit van gemiddeld 10 pups per drachtige moeder. In totaal gaat het dan om **192** moederdieren.

Volwassen rat cardiale myocyten

Er zal gebruik worden gemaakt van volwassen ratten. Uit eerdere ervaringen met volwassen rat cardiomyocyten, in samenwerking met een andere onderzoeksgroep, is gebleken dat voor onze experimenten per rat voldoende cellen geïsoleerd worden voor 1 biologische replicaat met 4 experimentele condities, bijvoorbeeld controle sham, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie sham en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd. Vier biologische replicaten per groep van alle condities geven optimale statistiek en er zijn 3 experimentele readouts (genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie). Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom $3 \times 4 = 12$ ratten nodig.

-*Gezonde ratten*: Voor de validering van 50 van de 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen in gezonde ratten hebben we daarom nodig $50 \times 12 =$ maximaal **600 ratten**. De leeftijd van de volwassen ratten op het moment van isolatie is niet van invloed op de kwaliteit van de cardiomyocyten in gezonde condities van de rat.

-*Ratten op speciaal dieet*: Cardiomyocyten die geïsoleerd worden uit pre-diabetische ratten op hoog vet dieet en "normaal vet dieet"-gevoerde controle ratten, naar schatting voor de validering van 10 kandidaat niet-coderend RNA moleculen, zullen bij aanvang (start dieet) 2-4 maanden oud zijn. Hiervoor zijn 10 kandidaatgenen $\times 12$ ratten per gen $\times 2$ groepen = **240 ratten** benodigd.

Estrogenen hebben een aanzienlijk effect op regulatie van glucose opname, GLUT4 translocatie, vetzuuropname en CD36 translocatie in het hart (Murphy E, Heart Fail Rev. 12: 293-300, 2007; Tepavcevic S, Horm Metab Res. 43: 524-30, 2011). Vanwege deze effecten van estrogenen kunnen de gegevens van beide sexen niet worden gecombineerd. Derhalve zou een gebruik van beide sexen een verdubbeling van de aantallen betekenen. Wij hebben gekozen om alleen experimenten te doen met mannelijke ratten om daarmee de effecten van estrogenen uit te sluiten.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

-Het gebruik van cellijnen is overwogen ter vervanging van de hier voorgestelde primaire cardiale cellen. Echter, de grote gevolgen van immortalisatie van deze cellen op hun differentiatiepotentieel, metabolisme en groei (zie bijvoorbeeld Monge et al. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Apr;87(4):318-26. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes)– processen die tijdens hartfalen een primaire rol spelen – maakt ze ongeschikt voor het bestuderen van de processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen secundair aan het metabole syndroom, namelijk metabolisme, celgroei en –differentiatie.

-Het gebruik van organoiden zal in de toekomst overwogen worden, maar momenteel zijn er nog geen organoiden van het hart ten behoeve van het bestuderen van hartfalenprocessen beschikbaar.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Kennis die uit deze samples gehaald wordt kan de voorgestelde celexperimenten niet vervangen, omdat hiermee slechts naar expressiepatronen gekeken kan worden, en in de samples geen interventie meer mogelijk zijn. De historische samples zullen de benodigde (cel)experimenten wel verminderen, omdat ze het selecteren van kansrijke kandidaatgenen ondersteunen.

Vermindering:

-Tijdens 1 isolatie van neonatale ratten worden zowel cardiale myocyten als fibroblasten gekweekt. Beide celtypen zullen gebruikt worden voor experimenten. De celcultuur is geoptimaliseerd door ruime ervaring; er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd. Wanneer van tevoren duidelijk is dat een geplande isolatie niet nodig is, zal deze tijdig geannuleerd worden.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Op basis van de kennis die uit deze samples gehaald wordt, wordt een keuze gemaakt voor het *in vitro* te bestuderen celtype. Zodoende worden onnodige celexperimenten voorkomen en het aantal dieren nodig voor celisolaties verminderd.

Verfijning: Het welzijn van de dieren wordt zo min mogelijk beïnvloed; de dieren ondergaan geen behandelingen of enkel een hoog vet dieet, dus geen invasieve behandelingen. Enkel wanneer er een indicatie is dat de beoogde kandidaat niet-coderend RNA moleculen een rol spelen in metabolisme, zal hun rol bestudeerd worden in cardiomyocyten van pre-diabetische ratten geïnduceerd door een hoog vet dieet. De cellen die uit de volwassen harten geïsoleerd worden zijn uitvoerig gekarakteriseerd binnen en buiten onze onderzoeksgroep, en er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd.

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 gaan niet in experiment maar worden op een zo humaan mogelijke wijze opgeofferd omwille van het gebruik van hun hart voor celisolaties.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

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?

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Moederdieren kunnen lichte stress ervaren

Volwassen rat cardiale myocyten

-Gezonde ratten: geen aantasting van welzijn verwacht.

-Ratten op speciaal dieet: De ratten die een hoog vet dieet gevoed krijgen ontwikkelen mogelijk huidproblemen, pre-diabetische symptomen zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte, polyurie/polydipsie en verminderde fysieke gezondheid. Het "normaal vet dieet" is gelijkaardig aan een regulier dieet, echter is net als het hoog vet dieet synthetisch met bekende samenstelling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Verstoring van nest

Volwassen rat cardiale myocyten

Het hoog vet dieet induceert een pre-diabetische staat in de rat.

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

Bij het bereiken van humane eindpunten zullen de dieren voortijdig worden opgeofferd.

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.

Bij gebrek aan ondernemingsgedrag, ernstige huidproblemen, immobiliteit en apathie zal een dier voortijdig worden opgeofferd.

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

0-5% van de dieren op een hoog vet dieet.

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.

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Neonatale ratten: terminaal

Moeder ratten: licht

Volwassen rat cardiale myocyten

Gezonde ratten: terminaal

Normaal vet dieet-gevoede ratten: terminaal

Hoog vet dieet-gevoede ratten: licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De neonatale en volwassen dieren worden gedood omdat hun hart volledig nodig is voor de isolatie van de cardiale cellen.

De moederdieren worden wanneer mogelijk in leven gehouden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Isolatie van beenmergcellen uit muizen

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.

Er zal gebruik worden gemaakt van volwassen, wild type en transgene muizen, deze zullen direct voor de isolatie worden opgeofferd. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncubeerd. De primaire uitkomstparameter is beenmerg isolatie tbv de isolatie van immuuncellen.

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.

Zowel de tibia's als de femurs zullen operatief verwijderd worden na euthanasie van de muis. Opeenvolgend worden na de uiteindes van de femurs en de tibias verwijderd zodat het beenmerg met een natuurlijke zoutoplossing uit de botjes kan worden gespoeld.

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

In ons lab hebben we reeds een ruime ervaring met isoleren van beenmergcellen uit muizen voor experimenten (zie bijvoorbeeld [REDACTED]). Statistiek is moeilijk toepasbaar op dit soort experimenten met kleine groepsgrootten; onze ervaring is dat 4 replicaten per groep een goed beeld geeft.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van mannelijke en vrouwelijke muizen. Ter bestudering van een kandidaat niet-coderend RNA molecuul bekijken we effecten op 3 experimentele readouts: genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie, respectievelijk, waarvoor om technische redenen verschillende monsters nodig zijn. Er zijn telkens 4 experimentele condities (controle ongestimuleerd, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie ongestimuleerd en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd). Per

experimentele conditie zijn er 4 replicaten met 1 miljoen cellen per replicaat. Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom 3 (experimentele readouts) maal 4 (experimentele condities) maal 4 (replicaten) = 48 miljoen cellen nodig. Voor de validering van 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen hebben we daarom 60x48 miljoen cellen = maximaal 2.880 miljoen cellen nodig. Een optimale isolatie resulteert in 10 miljoen cellen per dier. Gebaseerd op bovenstaande berekening vragen wij toestemming voor het gebruik van **288 dieren**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

-Het gebruik van cellijnen is overwogen ter vervanging van de hier voorgestelde primaire beenmerg cellen. Echter, deze aanpak geeft de mogelijkheid om de polarisatie (richting pro- of anti-inflammatoire macrofaag) en differentiatie van de geïsoleerde beenmergcellen te reguleren en te bestuderen, en de rol van kandidaat moleculen hierin. Daarnaast is het gebruik van cellijnen niet gewenst aangezien reeds gedifferentieerde cellen andere eigenschappen bezitten, verder verwijderd van de gewenste kenmerken (Passmore et al., Immunology 2001).

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Kennis die uit deze samples gehaald wordt kan de voorgestelde celexperimenten niet vervangen maar wel verminderen.

Vermindering:

-De celtoegankelijkheid is geoptimaliseerd door ruime ervaring; er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd. Tevens worden zowel de tibia als de femur gebruikt om het aantal geïsoleerde cellen zo hoog mogelijk te maken.

-Indien mogelijk worden beenmergcellen geogst uit muizen die voor een ander experimenteel doel werden geëuthanaseerd.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Op basis van de kennis die uit deze samples gehaald wordt, wordt een keuze gemaakt voor het *in vitro* te bestuderen celtype. Zodoende worden onnodige celexperimenten voorkomen en het aantal dieren nodig voor celisolaties verminderd.

Verfijning: Het welzijn van de dieren wordt zo min mogelijk beïnvloedt; de dieren ondergaan geen behandelingen. De cellen afkomstig van beenmerg isolatie worden uitvoerig gekarakteriseerd binnen en buiten onze onderzoeksgroep.

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

De dieren gaan niet in experiment maar worden op een zo humaan mogelijke wijze opgeofferd omwille van het gebruik van hun beenmerg voor celisolaties.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

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?

geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

nvt

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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.

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.

De muizen worden gedood omdat hun beenmerg volledig nodig is voor de isolatie van de immuuncellen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	3	Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen
Volgnummer	Type dierproef					
3	Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen					

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Arteriële hypertensie, aortaklepverkalking, myocardinfarct en virale infectie zijn belangrijke risicofactoren voor het ontwikkelen van hartfalen. Vaak hebben patiënten ook andere aandoeningen die onder het metabole syndroom vallen, zoals overgewicht en diabetes.

- Angiotensine II (AngII) is een peptide dat vrijkomt onder hypertensieve omstandigheden en zowel in de circulatie als perifeer werkt op de vaten (constrictie) en op de cellen (het promoot celgroei, ontsteking, bindweefselvorming). Om deze reden wordt in ons onderzoek vaak gekozen om chronische arteriële hypertensie na te bootsen en hartfalen te veroorzaken in muizen middels subcutane chronische angiotensine II infusie gedurende maximaal 12 weken. Bloeddruk zal enkel worden gemeten ter controle van het bloeddrukeffect van AngII en daarom volstaat een meting middels tail cuff.
- Phenylephrine is een sympathomimetisch medicijn dat de acties van epinephrine nabootst en arteriële hypertensie veroorzaakt, en wordt in experimentele modellen gegeven om acute hypertensie te veroorzaken en de onmiddellijke respons van het hart hierop te onderzoeken.
- Transverse aortic constriction (TAC) is de meest gebruikte en bestudeerde methode om aortaklepverkalking, leidend tot acuut hartfalen, na te bootsen in muizen. Het grootste voordeel van dit model is dat de drukgradient in de aortaboog gekwantificeerd kan worden, wat het mogelijk maakt om linker ventrikel hypertrofie te stratificeren. De acute hypertensie geïnduceerd door TAC veroorzaakt een 50% toename in linker ventrikel massa binnen twee weken, daarom is dit model een goede keuze voor het bestuderen van farmacologische and moleculaire interventies die hypertrofie kunnen remmen.
- Myocardinfarct (MI) in de muis is een veelgebruikt model om myocardremodellering in de mens, na

een infarct of bij vaatlijden, na te bootsen. Het afsterven van een deel van het hartweefsel veroorzaakt ontsteking en in tweede fase remodelering van het gezonde hartweefsel, inclusief cardiomyocyt hypertrofie en bindweefselvorming.

- Een acute virale infectie leidt tot verhoogde hartcelafbraak en ontsteking, en vormt daardoor een levensbedreigende situatie. Coxsackievirus B3 (CVB3)-infectie geïnduceerde myocarditis is het meest gebruikte en best bestudeerde model van acute myocarditis-geïnduceerd hartfalen in muizen. Het grootste voordeel van dit model is dat de ziekte progressie, cardiale ontsteking gevolgd door afbraak van hartspiercellen en fibrose vorming, nauw verwant is aan het klinische beeld.

AngII-behandeling, TAC, MI of CVB3 wordt gecombineerd met een hoogvetdieet in het geval het kandidaat niet-coderend RNA molecuul een rol blijkt te hebben in metabolisme.

De primaire uitkomstparameters zijn 1) hartfunctie gemeten met echocardiografie of MRI 2) hartgewicht en 3) cardiale/perifere celresponsen: cardiomyocyt hypertrofie en metabolisme, endotheeldysfunctie, ontstekingsrespons en/of cardiale bindweefselvorming. Secundaire uitkomstparameters zijn 4) insuline resistentie, 5) hyperglycemie en 6) hypercholesterolemie.

Het manipuleren van de aanwezigheid van individuele kandidaat niet-coderende RNA moleculen in de muis kan op twee manieren gebeuren:

- 1) injectie van een korte DNA sequentie al dan niet in een vector (oligo/antagomiR/mimic/adeno-geassocieerde virale vector)
- 2) transgene muis

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 dier zal een aantal behandelingen ondergaan:





- ¹⁾ deze handeling vindt niet plaats in transgene muizen waarin het kandidaat molecuul genetisch is gemodificeerd. In geval van injectie met adeno-geassocieerde virale vectoren, duurt het bereiken van optimale expressieniveaus is het hart 2-3 weken, waarna verdere behandeling pas kan plaatsvinden.
- ²⁾ deze handeling vindt enkel plaats voor kandidaat RNA moleculen waarvoor een functie in metabolisme is gevonden
- ³⁾ deze handeling vindt enkel plaats bij AngII behandeling

Een dier is maximaal 12 (max tijd tussen neonatale injectie en start behandeling) + 24 (max duur behandeling) = 36 weken in experiment. Dieren zijn nooit ouder dan 1 jaar bij opoffering.

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

Na vaststelling van de spreiding en het verwachte verschil per gen, op basis van de eerdere (in vitro) experimenten, zal gebruik worden gemaakt van de powerberekening obv de formule van Sachs om de definitieve groepsgrootten te berekenen. Ook kan dan de verwachte uitval gespecificeerd worden.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke wildtype of genetisch gemodificeerde muizen. Indien de genetisch gemodificeerde muizen reeds gefenotypeerd zijn door andere onderzoekers, zal gebruik worden gemaakt van muizen die onder normale niet-pathologische omstandigheden geen ongerief ondervinden van de genetische modificatie. Indien de genetisch gemodificeerde muizen nog gemaakt moeten worden, zal dit uitbesteed worden en zal het ongerief geregistreerd worden alvorens de dieren tbv dit onderzoek binnengehaald worden. De muizen worden geleverd door een vergund fokbedrijf of andere vergunde (internationale) universiteiten.

Per experiment/kandidaat molecuul zal gebruik worden gemaakt van maximaal 160 muizen. Er zijn maximaal 4 experimentele groepen (A1-A4) nodig. Per experimentele groep schatten we in, op basis van onze ervaring, maximaal 40 muizen te gebruiken (20 niet gemanipuleerde muizen en 20 muizen met gemanipuleerde kandidaatmolecuul expressie).

In 5 jaar tijd zullen maximaal 20 kandidaat moleculen onderzocht worden volgens het besluitmodel uit het projectvoorstel.

- Als uit de in vitro experimenten blijkt dat een kandidaatgen primair een rol speelt in cardiomyocyt dysfunctie en/of endotheeldysfunctie, zal gekozen worden voor TAC als experimenteel model van chronisch hartfalen.
 - o Vervolgens worden maximaal 16 kandidaatgenen ook onderzocht in een acuut model van arteriele hypertensie middels PE injectie, waarbij de primaire uitkomstparameter enkel cardiomyocyt hypertrofie is. Daarnaast wordt voor maximaal 16 kandidaatgenen het TAC experiment maximaal 2 maal herhaald: 1) voor het bepalen van de primaire

uitkomstparameter "cardiale/perifere celresponsen", die best worden gemeten vroeg na TAC (bijvoorbeeld na 1 week); en 2) voor de isolatie van hartcellen, waarvoor het hele hart nodig is en waarmee de rol van het kandidaatgen in elk celtype apart bepaald kan worden.

- Als uit de in vitro experimenten blijkt dat een kandidaatgen primair een rol speelt in ontsteking en/of bindweefselvorming, zal gekozen worden voor AngII als experimenteel model van hartfalen. Hierbij zullen per kandidaatgen maximaal 2 experimenten plaatsvinden voor het bepalen van de primaire uitkomstparameters; cellulaire responsen worden best gemeten vroeg na AngII (bijvoorbeeld na 1 week) en hartfalen wordt best gemeten laat na AngII (max 12 weken).
 - o Vervolgens wordt de rol van maximaal 16 kandidaatgenen ook bestudeerd in maximaal twee andere modellen van hartfalen waarbij ontsteking een rol speelt, namelijk MI- en/of CVB3-geïnduceerd hartfalen. Daarnaast wordt voor maximaal 16 kandidaatgenen het AngII experiment maximaal 2 maal herhaald: 1) voor het bepalen van de primaire uitkomstparameter "cardiale/perifere celresponsen", die best worden gemeten vroeg na AngII (bijvoorbeeld na 1 week); en 2) voor de isolatie van hartcellen, waarvoor het hele hart nodig is en waarmee de rol van het kandidaatgen in elk celtype apart bepaald kan worden.
- Als genen ook een rol in metabolisme hebben, wordt gekozen voor een combinatie van AngII, TAC, MI of CVB3 met hoog vet dieet.

Voor elk experiment zijn per kandidaat molecuul maximaal 160 muizen nodig. De volgende tabel geeft een samenvatting van de aantallen per experimenttype:

Wanneer oligos worden gebruikt voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, of genetisch gemodificeerde muizen, wordt gebruik gemaakt van 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van adeno-geassocieerde virale vectoren (AAV) voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van neonatale muizen (intracardiale injecties) of 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik gemaakt wordt van neonatale muizen voor de injectie van het AAV, wordt pas met AngII/hoog vet dieet/TAC operatie/MI operatie/PE begonnen zodra de muis volwassen is (8-12 weken oud). CVB3 wordt geïnjecteerd in muizen van minimaal 4 weken oud.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

-vervanging: Het hart is een complex orgaan dat uit meerdere celtypen bestaat en dat blootgesteld is aan elementen uit de circulatie (cellen, boodschappers waaronder RNA moleculen, voedingsstoffen, zuurstof etc). Als alternatief op dierproeven kunnen hartspiercellen worden blootgesteld aan media van bijvoorbeeld gekweekte ontstekingscellen om de interacties tussen deze celtypen na te bootsen (co-cultuur), of kunnen organoiden uit stamcellen worden gebruikt. Echter, deze benaderingen hebben een aantal cruciale tekortkomingen: 1) in geval van co-cultuur wordt de invloed van het lokale milieu van de cellen genegeerd; het extracellulaire klimaat en de overige buurcellen zoals endotheelcellen, fibroblasten, gladde spiercellen, dendritische cellen etc.; 2) in geval van co-cultuur en organoiden zijn dit gekweekte cellen die niet alle eigenschappen van primaire en natuurlijk gedifferentieerde cellen in hun natuurlijke omgeving hebben; 3) elke hartspiercel wordt gevoed door een bloedvat, celexperimentele condities missen de gereguleerde aanwezigheid van circulerende substanties zoals glucose, insuline en vetzuren alsook circulerende RNA moleculen. De *in vivo* omgeving is dermate complex dat proefdieronderzoek een cruciaal onderdeel zal blijven van proefondervindelijk medisch onderzoek gericht op het vinden van medicijnen. Voor het komen tot nieuwe inzichten voor de behandeling van hartfalen is het daarom noodzakelijk om proefdieren te gebruiken.

-vermindering: de statistische methode om tot een geschikte groepsgrootte te komen voor significante betekenisvolle resultaten, resultaten uit historische samples en uit *in vitro* onderzoek, het combineren van controlegroepen indien mogelijk, en de ervaring van de onderzoeksgroep met dit model, waarborgen het gebruik van zo min mogelijk dieren.

-verfijning: het huidige AngII model is een redelijk verfijnd model om hartfalen te bestuderen, gezien er geen invasieve operaties bij komen kijken. Het huidige TAC model is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om hartfalen te onderzoeken. Onze labtechnici worden continu getraind om de TAC en MI operaties uit te voeren en te verfijnen en daardoor het ongerief voor de muizen zo veel mogelijk te beperken, en doen dit inmiddels zonder het sternum in te knippen. Het model van CVB3 infectie is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om virale myocarditis te onderzoeken en door gebruik te maken van CVB3-geïnjecteerde muizen kunnen we de virale en ontstekingsrespons in het hart en de daaropvolgende ontwikkeling van hartfalen bestuderen (Fairweather and Rose PMC 2008). Het PE model is een geaccepteerd model van acute arteriële hypertensie met directe effecten op cardiomyocyten (Bueno et al. Circulation Research. 2001;88:88-96). De hartfunctie wordt op een non-invasie manier gemeten door middel van echo of MRI.

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

Dieren krijgen op de dag van de minipompimplantatie/TAC/MI operatie voorafgaand aan de operatie pijnstilling toegediend, en dit wordt zolang als nodig na operatie gegeven, gewoonlijk 1-3 dagen. De dieren worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen, en in geval van ziekte of pijn wordt een passende behandeling gezocht volgens vooraf vastgestelde humane eindpunten.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

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.

In geval de dieren een operatie ondergaan (minipompimplantatie, TAC of MI) krijgen de dieren peri-, per- en post-operatieve analgesie volgens geaccepteerde richtlijnen zoals GV SOLAS.

Alle dieren worden intensief gemonitord en bij afwijkend gedrag wijzend op pijn of ontsteking zal gepaste pijnstilling/ontstekingsremming worden ingezet.

De intracardale injectie in neonatale muizen wordt toegediend nadat de muizen tijdelijk en kortdurend op ijs hebben gelegen ter verdoving.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

-De neonatale dieren en hun moeders ondergaan lichte welzijnsaantasting in de vorm van verstoring van het nest. Tevens kan, wanneer toegepast, de intracardiale injectie leiden tot ongerief. Het virale construct zelf veroorzaakt geen ongerief.

-Daarnaast kan afhankelijk van het kandidaat molecuul, meer of minder ongerief worden ervaren. In het geval van het gebruik van virale vectoren is het ongerief door kandidaat molecuul manipulatie vooraf niet in te schatten. In het geval van het gebruik van transgene dieren is het ongerief voorafgaand aan de proef geregistreerd.

-Angiotensine II / TAC /MI/CVB3/PE worden toegepast om hartfalen te veroorzaken. Dit kan gepaard gaan met ademhalingsklachten en apathie.

-De minipompimplantatie en het openknippen van de huid voor TAC en MI operatie veroorzaken een huidwond die kan gaan ontsteken. De dieren kunnen verminderde mobiliteit ervaren.

-een PE injectie veroorzaakt een acute steiging in bloeddruk en kan gepaard gaan met hoofdpijn en duizeligheid.

-Hoogvetdieet: het vet in de voeding kan de vacht vettig maken. Het zelfverzorgend gedrag van de dieren zal dus nauwlettend in het oog worden gehouden. De muizen die een hoog vet dieet gevoed krijgen ontwikkelen pre-diabetes symptomen, zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte en verminderde fysieke gezondheid.

-CVB3 veroorzaakt in bepaalde muizenstammen gastro-intestinale klachten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Angiotensine II induceert hartfalen in de muizen met bovenbenoemde symptomen.

Het afbinden van de aorta (TAC) en MI induceren beide een hoge cardiale druk in het linker ventrikel en uiteindelijk ontwikkelen de muizen hartfalen met bovenbenoemde symptomen.

PE veroorzaakt acute hypertensie met bovenbenoemde symptomen.

Het hoog vet dieet induceert een pre-diabetes staat in de muizen.

Virale myocarditis gaat gepaard met een sterke ontstekingsreactie in het hart die hartfalen veroorzaakt.

Daarnaast is CVB3 is een enterovirus met gastrointestinale effecten.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen om aantasting van hun welzijn tijdig te ontdekken, waarna een besluit zal worden genomen het dier al dan niet uit experiment te halen met het oog op de vastgestelde humane eindpunten.

Er wordt a-septisch gewerkt om ontsteking van de wond na minipompimplantatie resp. TAC/MI operatie te voorkomen.

Tevens wordt, wanneer nodig, in neonatale muizen de intracardiale injectie uitgevoerd onder hypothermische omstandigheden door een ervaren dierproef deskundige ter voorkoming van complicaties en ongerief.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- open wond na minipompimplantatie met naar buiten komen van het pompje en ontsteking die niet reageert op behandeling.
- hartfalen ten gevolge van AngII-behandeling resp. TAC/MI / CVB3 infectie al dan niet in combi met hoog vet dieet, gepaard met moeilijk ademen en apathie. De mate van ongerief wordt ingeschat op basis van grimace scale, algemene indruk, activiteit, houding, gedrag, verzorging, verloop lichaamsconditie en gewicht, ademhaling, kleur mucosa, hartfunctiemetingen.
- Koorts en dehydratie ten gevolge van CVB3 infectie.
- Neonatale pups: geen melkspot/ verstoten uit nest.
- Ernstige huidproblemen als gevolg van hoog vet dieet.
- overige ziektes of condities welke ernstige pijn, ongerief of lijden indiceren.

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

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.

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.

Organen worden geexplanteerd tbv moleculair en histologisch onderzoek.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	4	Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene db ^{-/-} muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Kandidaat niet-coderende RNA moleculen die een rol blijken te hebben in het ontwikkelen van hartfalen in een pre-diabetes model (angII/TAC + hoog vet dieet), zullen nader onderzocht worden in een meer vergevorderd diabetes model. Hiervoor maken we gebruik van transgene db^{-/-} muizen. Deze muizen zijn een geaccepteerd en goed bestudeerd model voor obesitas en type 2 diabetes. De muizen presenteren zich met diabetische symptomen die een leeftijdsgebonden progressie volgen, wat ook wordt gezien in patiënten met het diabetes. Daarnaast wordt in deze muizen ook een vroege insuline resistentie gedetecteerd dat resulteert in hyperglycemia. Db^{-/-} muizen worden gebruikt voor het bestuderen van cardiale gevolgen van diabetes, zoals diabetische cardiomyopathie.

Om de rol van de kandidaat moleculen te bestuderen in het metabole syndroom (diabetes, obesitas en hypertensie), worden de db^{-/-} muizen blootgesteld aan drukoverbelasting door AngII infusie of TAC operatie. Dit zal een meer klinisch relevant beeld geven van de patiënten die zich presenteren met het metabole syndroom in de kliniek.

De primaire uitkomstparameters zijn 1) hartfunctie gemeten met echocardiografie of MRI 2) hartgewicht en 3) cardiale/perifere celresponsen: cardiomyocyt hypertrofie en metabolisme, endotheeldysfunctie, ontstekingsrespons en/of cardiale bindweefselvorming. Secundaire uitkomstparameters zijn 4) insuline resistentie, 5) hyperglycemie en 6) hypercholesterolemie. Bloeddruk zal enkel worden gemeten ter controle van het bloeddrukeffect van Angiotensine II en daarom volstaat een meting middels tail cuff.

Het manipuleren van de aanwezigheid van individuele kandidaat niet-coderende RNA moleculen in de muis zal gebeuren door de injectie van een korte DNA sequentie (oligo/antagomiR/mimic/adeno-geassocieerde

virale vector).

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 dier zal een aantal behandelingen ondergaan:



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

Na vaststelling van de spreiding en het verwachte verschil per gen, op basis van de eerdere (in vitro) experimenten, zal gebruik worden gemaakt van de powerberekening obv de formule van Sachs om de definitieve groeps grootten te berekenen. Ook kan dan de verwachte uitval gespecificeerd worden.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen (mannelijk en vrouwelijke) met een Db-/- achtergrond en controle db^{+/+} muizen. De muizen worden geleverd door een vergund fokbedrijf of andere vergunde (internationale) universiteiten.

Per experiment/kandidaat molecuul schatten we in, op basis van onze ervaring, maximaal 160 muizen te gebruiken (40 per experimentele groep; 20 niet gemanipuleerde muizen en 20 muizen met gemanipuleerde kandidaatmolecuul expressie). Het aantal experimentele groepen per experiment is 4:

In 5 jaar tijd zullen maximaal 16 kandidaat moleculen onderzocht worden met deze methode. In totaal wordt er dus geschat zo'n **2560 muizen** nodig te hebben.

Wanneer oligos worden gebruikt voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van adeno-geassocieerde virale vectoren voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van neonatale muizen van WT drachtige moeders of 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruikt wordt van neonatale muizen voor de injectie van het virus, wordt pas met angiotensine II begonnen zodra de muis volwassen is (8-12 weken oud).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

-vervanging: Het hart is een complex orgaan dat uit meerdere celtypen bestaat en dat blootgesteld is aan elementen uit de circulatie (cellen, boodschappers waaronder RNA moleculen, voedingsstoffen, zuurstof etc). Als alternatief op dierproeven kunnen hartspiercellen worden blootgesteld aan media van bijvoorbeeld gekweekte ontstekingscellen om de interacties tussen deze celtypen na te bootsen (co-cultuur), of kunnen organoïden uit stamcellen worden gebruikt. Echter, deze benaderingen hebben een aantal cruciale tekortkomingen: 1) in geval van co-cultuur wordt de invloed van het lokale milieu van de cellen genegeerd; het extracellulaire klimaat en de overige buurcellen zoals endotheelcellen, fibroblasten, gladde spiercellen, dendritische cellen etc.; 2) in geval van co-cultuur en organoïden zijn dit gekweekte cellen die niet alle eigenschappen van primaire en natuurlijk gedifferentieerde cellen in hun natuurlijke omgeving hebben; 3) elke hartspiercel wordt gevoed door een bloedvat, celexperimentele condities missen de gereguleerde aanwezigheid van circulerende substanties zoals glucose, insuline en vetzuren alsook circulerende RNA moleculen. De *in vivo* omgeving is dermate complex dat proefdieronderzoek een cruciaal onderdeel zal blijven van proefondervindelijk medisch onderzoek gericht op het vinden van medicijnen. Voor het komen tot nieuwe inzichten voor de behandeling van hartfalen is het daarom noodzakelijk om proefdieren te gebruiken.

-vermindering: de statistische methode om tot een geschikte groepsgrootte te komen voor significante betekenisvolle resultaten, resultaten uit historische samples en uit *in vitro* onderzoek, het combineren van controlegroepen indien mogelijk, en de ervaring van de onderzoeksgroep met dit model, waarborgen het gebruik van zo min mogelijk dieren.

-verfijning: het huidige model is een redelijk verfijnd model om het metabole syndroom te bestuderen, gezien er geen invasieve operaties bij komen kijken en de muizen spontaan obesitas en diabetes ontwikkelen. Het huidige TAC model is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om hartfalen te onderzoeken. Onze labtechnici worden continu getraind om de TAC operatie uit te voeren en te verfijnen en daardoor het ongerief voor de muizen zo veel mogelijk te beperken, en doen dit inmiddels zonder het sternum in te knippen. De hartfunctie wordt op een non-invasie manier gemeten door middel van echo of MRI.

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

Dieren krijgen op de dag van de minipompimplantatie/TAC operatie voorafgaand aan de operatie pijnstilling toegediend, en dit wordt zolang als nodig na operatie gegeven, gewoonlijk 1-3 dagen. Alle dieren worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen en in geval van ziekte of pijn wordt een passende behandeling gezocht volgens vooraf vastgestelde humane eindpunten.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

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.

De dieren krijgen peri-, per- en post-operatieve analgesie volgens geaccepteerde richtlijnen zoals GV SOLAS. De dieren worden intensief gemonitord en bij afwijkend gedrag wijzend op pijn of ontsteking zal gepaste pijnstilling/ontstekingsremming worden ingezet.

De intracardiale injectie in neonatale muizen wordt toegediend nadat de muizen tijdelijk en kortdurend op ijs hebben gelegen ter verdoving.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

-De neonatale dieren en hun moeders ondergaan lichte welzijnsaantasting in de vorm van verstoring van het nest. Tevens kan, wanneer toegepast, de intracardiale injectie leiden tot ongerief. Het virale construct zelf veroorzaakt geen ongerief.

-Daarnaast kan afhankelijk van het kandidaat molecuul, meer of minder ongerief worden ervaren door de genmanipulatie. Dit is vooraf niet in te schatten.

-AngII/TAC wordt toegepast om hartfalen te veroorzaken. Dit kan gepaard gaan met ademhalingsklachten en apathie.

-De minipompimplantatie en het openknippen van de huid voor TAC operatie veroorzaken een huidwond die kan gaan ontsteken of slecht helen tgv diabetes. De dieren kunnen verminderde mobiliteit ervaren.

-db^{-/-}: Deze dieren ontwikkelen diabetische symptomen, zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte, polyurie, polydipsie, slechte wondheling en verminderde fysieke gezondheid.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Angiotensine II induceert hartfalen in de muizen met bovenbenoemde symptomen.

Het afbinden van de aorta (TAC) induceert een hoge cardiale druk in het linker ventrikel en uiteindelijk ontwikkelen de muizen hartfalen met bovenbenoemde symptomen.

Db^{-/-} knockout induceert obesitas en diabetes.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen om aantasting van hun welzijn tijdig te ontdekken, waarna een besluit zal worden genomen het dier al dan niet uit experiment te halen met het oog op de vastgestelde humane eindpunten. Diabete muizen krijgen aangepaste verzorging/ huisvesting passend bij het ziektemodel.

Er wordt a-septisch gewerkt om ontsteking van de wond na minipompimplantatie resp. TAC operatie te voorkomen.

Tevens wordt, wanneer nodig, in neonatale muizen de intracardiale injectie uitgevoerd onder hypothermische omstandigheden door een ervaren dierproef deskundige ter voorkoming van complicaties en ongerief.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- open wond na minipompimplantatie met naar buiten komen van het pompje en en ontsteking die niet reageert op behandeling.
- hartfalen ten gevolge van AngII-behandeling resp. TAC, gepaard met moeilijk ademen en apathie.
- overige ziektes of condities welke ernstige pijn, ongerief of lijden indiceren. Db^{-/-} muizen ervaren ernstige immobiliteit als gevolg van ernstig overgewicht en diabetes. Mate van ongerief wordt o.a. bepaald aan de hand van grimace scale, algemene indruk, activiteit, houding, gedrag, verzorging, verloop lichaamsconditie en gewicht, ademhaling, kleur mucosa, hartfunctiemetingen.

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

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.

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.

Organen worden geexplanteerd tbv moleculair en histologisch onderzoek.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

DEC-advies PV 2016-007/ [REDACTED]

Preambule:

De vragen en de bijbehorende antwoorden, genummerd: 3.2 Doel, vraag 2 en antwoord daarop doen wij U vertrouwelijk toekomen indachtig op artikel 10 lid 1 aanhef en onder f en g van de Wet Openbaarheid van Bestuur.

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen.*
3. **Titel van de NTS:** *Rol van nieuwe genen in de ontwikkeling van hartfalen.*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC: *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. **Adviestraject** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC; 19-01-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken; 27-01-2017
 - 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. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum; 03-02-2017

- **Gestelde vragen en antwoorden:**

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Vraag:

1. U geeft aan dat hyperaldosteronisme bij muizen leidt tot cardiale fibrosering. In hoeverre is bij de mens wetenschappelijk onderbouwd dat aldosteron c.q. hyperaldosteronisme leidt tot (analoge) cardiale fibrosering?

Antwoord:

Ik verwijs naar een review van Patel en Mehta (2012) waarin de rol van het renine-angiotensine-aldosteron systeem in diabetes en cardiovasculaire ziektes wordt beschreven. Hierin wordt duidelijk dat zowel angiotensine II (in dit PV als model gebruikt) als aldosteron cardiale fibrosering kunnen veroorzaken. Er is een recente review verschenen waarin wordt gesteld dat simultane inhibitie van RAAS componenten, inclusief aldosteron en angiotensine II, cardiale fibrosering verlaagt in patiënten met diabetes en hypertensie (Uijl E et al. From ARB to ARNI in Cardiovascular Control. Curr Hypertens Rep. 2016 Dec;18(12):86). In ons muismodel is angiotensine II-behandeling voldoende om cardiale fibrosering te veroorzaken.

3.2 Doel

Vraag:

1. Om de rol van miRNA en lncRNA te onderzoeken wordt o.a. gebruik gemaakt van antagomiR constructen. De DEC-UM vraagt zich af welke effecten deze hebben na toediening op het totale organisme en of deze effecten daarom een indirecte invloed hebben op het hartweefsel.

Antwoord:

Het doel van het project is om de rol van niet-coderende RNA moleculen in hartfalen te onderzoeken in cel- en muizenmodellen van diabetes, obesitas en/of hypertensie (diabetes/hypertensie/metabool syndroom). Niet-coderende RNA moleculen kunnen buiten het hart ook processen in het lichaam beïnvloeden die tot hartfalen leiden, zoals de functie van de perifere vaten.

[Redacted text block]

3. U schrijft onder het kopje ‘samenhang’ dat “microvasculaire dysfunctie leidt tot ontsteking door verhoogde permeabiliteit van de vaten”. Is verhoogde vaatpermeabiliteit niet juist een gevolg van de ontsteking? En de ontsteking een gevolg van activatie van het endotheel?

Antwoord:

De tekst is aangepast in:

Microvasculaire dysfunctie en ontsteking hebben een wisselwerking op elkaar; het door het metabole syndroom geactiveerde endotheel trekt ontstekingscellen aan, en op zijn beurt verhoogt ontsteking de permeabiliteit van de vaten.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1

Vraag:

1. De strategie omschrijft duidelijk de verschillende fases van het onderzoeksproject (*in vitro* tot patiënt). De DEC-UM vraagt om duidelijker aan te geven bij welke fase van het onderzoeksproject proefdieren noodzakelijk zijn. Verder vraagt de DEC-UM om de fase diermodellen duidelijker uit te werken met go/no-go beslismomenten op basis van de vraagstelling.

Antwoord:

In het PV, paragraaf 3.4.1, is nu per stap aangegeven of er nieuwe dierproeven nodig zijn, bijvoorbeeld als volgt: “Voor deze eerste stap van het onderzoek zijn derhalve geen dierproeven nodig”. Go/no-go beslismomenten zijn nu aangegeven in paragraaf 3.4.3 van het PV.

2. Op welke basis wordt verwacht om tot 20 kandidaatgenen te komen vanuit de 60 screened genen?

Antwoord:

In het PV hebben we geprobeerd dit als volgt te verduidelijken:

We schatten in zo'n **20 kandidaatgenen** te kiezen naar aanleiding van resultaten uit bovenstaande *in vitro* experimenten, om deze in stap 3) *in vivo* te bestuderen. Dit aantal is een schatting gebaseerd op 1) ervaring met het valideren van grootschalige genexpressie data, die in de praktijk in $\pm 70\%$ van de genen worden bevestigd, 2) het daarop volgende uitgebreide literatuuronderzoek om uit te sluiten dat de rol van een kandidaatgen al door andere onderzoekers wordt onderzocht, en 3) onze ervaring met het pre-valideren van de functies van kandidaatgenen middels *in vitro* celexperimenten, waaruit blijkt dat een klein deel van de kandidaatgenen geen actieve rol spelen in hartfalen processen.

3. Wat is de relevantie van viraal hartfalen voor metabool syndroom-hartfalen?

Antwoord:

We verwijzen graag naar het antwoord op vraag 2 bij punt 3.2 Doel.

4. Bij ‘validatie’: Hoe relevant is het bestuderen van moleculaire processen in neonatale primaire cellen ten opzichte van het ontwikkelen van hartfalen in volwassenen?

Antwoord:

Er zijn voor- en nadelen aan het gebruik van neonatale cellen voor de bestudering van “volwassen” hartfalen processen (Louch et al. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Sep; 51(3): 288–298). Voordeel is dat hartfalen in feite deels een herprogrammering van cardiomyocyten is richting neonatale genexpressie, wat dit model zeer representatief maakt. Aan de andere kant zijn deze cellen nooit volwassen geweest, dus ondergaan geen herprogrammering. Neonatale hartspiercellen zijn door hun relatieve toegankelijkheid (gemak van isolatie) en gemak om mee te kweken het meest gebruikte en geaccepteerde *in vitro* model van hypertrofie en hartfalen, zodat hier veel kennis over is.

Bovenstaande is als nabeschouwing (NB) toegevoegd aan paragraaf 3.4.1 bij punt 2) “validatie in historische samples en *in vitro* modellen”.

3.4.2

Algemene opmerking:

1. Niet alleen NSAIDs interfereren met ontsteking: er zijn aanwijzingen dat andere soorten pijnstillers (bv. opioïden) dit ook doen.

Dit is de reden dat in reuma-onderzoek bijvoorbeeld nooit pijnstilling mogelijk is. De DEC-UM adviseert U daar rekening mee te houden. Wellicht is het beter om op grond hiervan geen pijnstilling te gebruiken in de dieren waar ontsteking verwacht en gewenst wordt. Wanneer U hiervoor kiest, zult U ook de humane eindpunten scherper moeten omlijnen voor deze dieren.

Antwoord:

Dit is een belangrijk punt. De tekst in het PV is aangepast in:

Omdat NSAID's en opioïden interfereren met ontsteking, zal in geval dat ontsteking een primaire uitkomstmaat is, afgeweken worden van de GV SOLAS richtlijnen voor pijnbestrijding en geen analgesie toegepast worden. In dat geval worden de humane eindpunten nog scherper omlijnd.

Vragen:

1. De DEC-UM vraagt om duidelijker te omschrijven waarom de verschillende muizenmodellen noodzakelijk zijn. Aangezien de doelstelling aangeeft om meerdere risicofactoren te combineren en tevens de 5 pathofysiologische processen mee te nemen, lijken de muismodellen AngII + hoog vet dieet en TAC + hoog vet dieet de meest aangewezen modellen. Zie ook tabel 2.

Antwoord:

Zowel de bestudering van combinaties van risicofactoren als individuele risicofactoren in diermodellen is klinisch relevant; niet alle patiënten hebben dezelfde combinatie. Beide benaderingen zijn bovendien noodzakelijk om de exacte rol van kandidaatgenen te bepalen, bijvoorbeeld omdat drukoverbelasting en diabetes tegengestelde effecten kunnen hebben op cardiomyocyt metabolisme. Het is belangrijk te bepalen welke (combinatie van) risicofactoren welke moleculaire gevolgen heeft die worden bepaald door het kandidaatgen. De keuze voor een specifiek model zal afhangen van de combinatie van data die voortvloeit uit het historisch en in vitro onderzoek. Hiervan hebben we additionele voorbeelden gegeven in paragraaf 3.4.3. bij de keuzemomenten.

2. Zou het niet beter zijn om de kansrijke kandidaten eerst te bestuderen in het diabetesmodel? U weet als het goed is in dit stadium al waar de miRNAs op inwerken en dus zou het testen in minder diermodellen kunnen plaatsvinden?

Antwoord:

Het doel zal altijd zijn het testen in zo min mogelijk dieren te laten plaatsvinden. We zijn het eens met uw constatering dat in dit stadium bekend is waar de miRNAs op inwerken en verwijzen graag naar het antwoord op vraag 1 van deze paragraaf.

3.4.4

Appendix 1

Algemene opmerkingen:

1. De DEC-UM vraagt zich af waarom gekozen wordt voor rat cardiale myocyten en niet voor muis, aangezien de diermodellen verder in de aanvraag allemaal muis zijn.

Antwoord:

Hartcellen uit rat en muis zijn vergelijkbaar. De keuze voor rat is gebaseerd op onze ervaring met deze cellen (>10 jaar), en op het feit dat er uit rattenharten meer cellen gehaald worden dan uit muizenharten.

2. Hoe wordt eigenlijk de experimentele conditie hartfalen opgewekt bij cardiomyocyten *in vitro*?

Antwoord:

De cardiomyocyten worden blootgesteld aan hypertrofe stimuli, inclusief endotheline 1 en phenylephrine, die inwerken op de belangrijkste pro-hypertrofe receptoren, respectievelijk de GPCRs en adrenerge receptoren. Deze stimuli veroorzaken de activatie van hypertrofe genexpressie, waaronder de natriuretische peptiden BNP en ANF, die ook klinisch hartfalen kenmerken.

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. Kunt U nader toelichten waarom bij de winning van cardiomyocyten bij hoog vet dieet enkel mannelijke dieren worden gebruikt en voor het overige dieren van beide geslachten?

Antwoord:

Bij de winning van alle adulte cardiomyocyten (niet enkel de dieren op hoog vet dieet) wordt gebruik gemaakt van enkel mannelijke dieren, omdat het doel van deze proeven is de bepaling van de rol van kandidaatgenen in cardiomyocyt metabolisme. Omdat estrogeen hierop van invloed zijn, kiezen we voor mannelijke dieren.

Om te verduidelijken dat het om alle adulte dieren gaat, zijn we voor dit deel van de paragraaf een nieuwe alinea gestart.

C. Hergebruik.

2. De DEC-UM vraagt om te overwegen de moederdieren te hergebruiken voor volwassen myocyt isolatie. Kan er een interne fok opgezet worden zodat moederdieren meerdere nesten kunnen werpen?

Antwoord:

We verwijzen graag naar het antwoord op vorige vraag. Moederdieren zijn daarenboven hormonaal nog meer belast dan niet-zwangere vrouwelijke dieren.

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

3. De DEC-UM vraagt zich af of een eerste reductie in kandidaatgenen mogelijk is op basis van geïmmortaliseerde cellijnen ondanks hun beperkingen.

Antwoord:

Geïmmortaliseerde cellijnen zijn met name bruikbaar bij het beantwoorden van specifieke subvragen die inzoomen op een moleculair proces, en waarbij bekend is dat de cellijnen hiervoor geschikt zijn. Bijvoorbeeld kunnen H9C2 cellen gebruikt worden voor het bestuderen van autofagie, een van de vele subprocessen van hartfalen. Hiertoe moeten hypothese en in vivo rol van het kandidaatgen reeds verder uitgekristalliseerd zijn. Helaas zijn de cellijnen niet geschikt om “hartfalen” op celniveau te bestuderen, en dit is wel nodig voor besluitvorming of een kandidaatgen verder bestudeerd moet worden in diermodellen.

E. Herhaling.

4. Hoe ondervangt U eventuele duplicatie.

Antwoord:

We hebben de suggestie als volgt verwerkt in alle appendices in de tekst bij E. Herhaling: Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

K. Classificatie van ongerief.

5. De appendix omvat geen normaal vet dieet gevoede ratten. Het lijkt dat Hoog vet dieet gevoede ratten ook een terminaal experiment is. De DEC-UM verzoekt het normale vet dieet nader te omschrijven.

Antwoord:

Het normale vet dieet is net als het hoog vet dieet een synthetisch dieet. Het reguliere “chow” dieet is niet synthetisch zodat de inhoud van dit dieet niet gematcht is met die van het hoog vet dieet. Matching op inhoud van dieet is belangrijk, omdat enkel de aanwezigheid van vetten in het dieet verschillend dient te zijn.

De appendix was inderdaad incompleet, en is nu aangevuld met een groep ratten die, naast de hoog vet dieet gevoerde ratten, een normaal vet dieet krijgen. Deze aanpassingen zijn in grijs gemarkeerd in paragrafen A, B en I. Ons inziens blijft de classificatie van de normaal vet dieet gevoerde ratten “terminaal”, omdat dit dieet geen ongerief veroorzaakt.

Appendix 2

Algemene opmerking:

1. De DEC-UM vraagt zich af of splenocytes ook kunnen gebruikt worden voor de isolatie van immuuncellen, waardoor minder dieren nodig zijn.

Antwoord: dit is helaas niet mogelijk, omdat 1) de overgrote meerderheid immuuncellen in de milt uit B cellen bestaat, en 2) de minderheid aan monocyt/macrofagen die uit de milt worden geïsoleerd al ver doorgedifferentieerd zijn. Beenmergcellen hebben als voordeel dat ze in kweek sterk vermeerderd kunnen worden terwijl ze differentiëren richting macrofaag.

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. **App 2-3 en 4:** Waarom wordt de huid gekliefd middels knippen i.p.v. snijden?

Antwoord:

Zo wordt dit in de goedgekeurde SOPs voorgesteld.

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

2. **App 1 t/m 7:** De DEC-UM vraagt zich af wat de zo humaan mogelijke wijze van opoffering inhoudt.

Antwoord:

Dit is een overbodige zin want het spreekt voor zich dat de opoffering van dieren op humane wijze gebeurt, dit wil zeggen zonder dat het dier dit merkt. De zin is verwijderd uit de appendices.

Appendix 3

Algemene opmerkingen:

1. **App 1 t/m 7(waar van toepassing):** In de laatste alinea van A wordt gemeld dat de formule van Sachs wordt gebruikt om de groeps grootte te berekenen, terwijl in B de groeps grootte nu al bekend lijkt. Kunt U dit toelichten? De DEC-UM vraagt zich af of er een inschatting kan gegeven worden van de spreiding en het verwachte verschil.

Hoeveel dieren worden er maximum per groep verwacht en welke onderbouwing wordt hiervoor gehanteerd? Kan uitval gespecificeerd worden?

Antwoord:

De gegeven aantallen zijn een schatting op basis van onze historische ervaring.

Per experiment zal in een later stadium het definitief benodigde aantal dieren berekend worden met de formule van Sachs, zodra per gen en op basis van de eerdere (in vitro) experimenten de spreiding en het verwachte verschil bekend zijn. Ook kan uitval dan gespecificeerd worden.

In de appendices is dit als volgt aangepast:

- onder A:

Na vaststelling van de spreiding en het verwachte verschil per gen, op basis van de eerdere (in vitro) experimenten, zal gebruik worden gemaakt van de powerberekening o.b.v. de formule van Sachs om de definitieve groepsgrootten te berekenen. Ook kan dan de verwachte uitval gespecificeerd worden.

- onder B:

Per experimentele groep schatten we in, op basis van onze ervaring, maximaal 40 muizen te gebruiken (20 niet gemanipuleerde muizen en 20 muizen met gemanipuleerde kandidaatmolecul expressie).

Vraag:

Waarom 80 x 6 en niet 80 x 10 bij 10 kandidaat moleculen? Hoe verloopt de berekening van de groepsgrootte en hoe is eventuele uitval verdisconteerd?

Antwoord:

De gegeven aantallen zijn schattingen van het maximum aan dieren; eventuele uitval is hierin meegenomen maar deze kan pas definitief vastgesteld worden per gen na het uitvoeren van de voorafgaande (in vitro) experimenten. Omdat het om schattingen gaat voor het maximaal benodigde aantal dieren, en de verschillende experimentele aanpakken nu in 1 appendix worden samengenomen, is besloten om de weergave van de maximum aantallen in appendix 3 en 4 te vereenvoudigen. We gaan nu uit van maximaal 4 experimentele groepen per experiment per kandidaatgen, en hebben de aantallen hierop berekend. Pas bij het bekend worden van de experimentele aanpak o.b.v. de eerste in vitro experimenten kunnen aantallen definitief worden berekend in werkprotocollen.

Vraag:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. Uitleg noot 1 en 2 ontbreekt.

Antwoord:

Uitleg is toegevoegd en grijs gemarkeerd.

Appendix 5

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. Kunt U het waarom van de drie genoemde tijdstipmomenten ter bestudering van het ziekteverloop nader onderbouwen?

Antwoord:

Er is nu gekozen om de experimentele aanpak uit appendix 5 pas in stap 4, de tweede in vivo validatiestap, uit te voeren. Op dat moment is duidelijk welk tijdstipmoment na CVB3 infectie we willen bestuderen, afhankelijk van welke primaire uitkomstparameter naar voren komt uit stap 3, de eerste in vivo validatie stap. De experimentele aanpak uit appendix 5 is nu geïncorporeerd in appendix 3.

B. De Dieren.

2. In appendix 3 worden 10 kandidaatgenen onderzocht. Hier wordt aangegeven dat dit 15 kandidaatgenen zijn.

De DEC-UM gaat ervan uit dat in beide diermodellen dezelfde genen getest worden.

Indien dit niet zo is, graag een duidelijke onderbouwing. Welk aantal dieren is correct?

Antwoord:

Na het opnieuw bepalen van het stappenplan is besloten in stap 4, waarbij ook CVB3-infectie hoort, maximaal 16 kandidaatgenen te onderzoeken.

Zonder de resultaten van de historische en *in vitro* vooronderzoeken (stappen 1 en 2) kunnen we slechts gissen naar het aantal genen dat betrokken blijkt te zijn bij ontsteking, relevant voor het CVB3 experiment. Bij de huidige berekeningen gaan we er daarom van uit dat alle kandidaatgenen die door de eerste *in vivo* validatie in stap 3) komen een rol in ontsteking blijken te spelen. In werkelijkheid zullen deze aantallen lager liggen, maar hierover zijn voorafgaand aan het completeren van stappen 1) en 2) geen uitspraken te doen. De aantallen zijn aangepast en grijs gemarkeerd in appendix 3 onder B en in de tabel in K.

De aantallen zijn ook aangepast en grijs gemarkeerd in de NTS:

Muizen: totaal 18848 (100%)

1. terminaal experiment: 288 (2%)

3. ongerief is matig: 17920 (95%)

4. ongerief is ernstig: 640 (3%)

J. Humane eindpunten.

3. Misstaan koorts en dehydratie (ten gevolge van diarree) hier niet daar het een enteraal virus betreft?

Antwoord:

Dit is correct, nu toegevoegd aan J in appendix 3:

Koorts en dehydratie ten gevolge van CVB3-infectie.

Appendix 6

Vraag:

F. Huisvesting en verzorging.

1. Wat is aangepaste huisvesting van dieren met diabetes mellitus?

Antwoord:

Er wordt aangegeven dat de dieren geen aangepaste huisvesting nodig hebben. Wel drinken dieren met diabetes mellitus extra veel, en zullen de waterflessen mogelijk vaker worden bijgevuld.

Appendix 7

Vraag:

B. De Dieren.

1. Deze bijlage beschrijft een dierproef met het meest ernstige ongerief. Op basis van alle voorgaande dierexperimenten zou bijvoorbeeld een drietal miRNA's uit de bus kunnen komen als meest veelbelovend.

Waarom bent U voornemens hier weer 10 kandidaatgenen te testen en niet bijvoorbeeld de drie meest veelbelovende? Hetzelfde zou gezegd kunnen worden *mutatis mutandis* over de vorige bijlage waar ook maar liefst 10 kandidaatgenen worden getest. Kunt U de groepsgrootte van 25 dieren in deze bijlage nader onderbouwen.

Antwoord:

We gaan ervan uit dat 16 van de 20 kandidaatgenen in de eerste ronde *in vivo* experimenten (stap 3 en bijlage 3) een rol blijken te spelen in hartfalen, en daarom verder onderzocht worden in deze tweede ronde (stap 4 en bijlage 4).

Deze kans is reëel, omdat het vooronderzoek met historische monsters en *in vitro* experimenten gedegen is, en in het verleden heeft uitgewezen tot een goede kandidaatgenselectie te leiden. De geschatte groepsgrootte is op 20 gezet voor alle experimenten.

- Datum antwoord; 01-03-2017
- Verstreckte antwoorden; *Zie hierboven*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts: **N.V.T.**

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**
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. **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 doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC-UM vertrouwt erop 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-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel van het project is om de rol van niet-coderendeRNA moleculen in hartfalen te onderzoeken in cel- en muizenmodellen van diabetes, obesitas en/of hypertensie (diabetes/metaboolsyndroom).

Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van nieuwe fundamentele inzichten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen.

Het betreft hier een fundamenteel en translationeel project.

Er is binnen dit project wel een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project.

De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.

Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen op dit moment nog beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden en dat daar op dit terrein ook behoefte aan is. De DEC-UM is van mening dat het directe doel, het onderzoeken van de rol van niet-coderendeRNA moleculen in hartfalen in cel- en muizenmodellen van diabetes, obesitas en/of hypertensie (diabetes/metaboolsyndroom), gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

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 fundamenteel en toegepast wetenschappelijke project, dat gericht is op het verkrijgen van nieuwe fundamentele inzichten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van (metabool) hartfalen (HfpEF), zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep, d.w.z. personen die hartfalen ontwikkelen en hun naasten, en ook de medische wetenschap en de samenleving als geheel.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen verschillende categorieën ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de medisch-wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over de pathofysiologische processen die bijdragen aan de ontwikkeling van HfpEF. Daardoor wordt het mogelijk nieuwe therapeutische targets te identificeren en tracht men te komen tot effectieve behandelwijzen met "therapie-op-maat".

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Verbeterde therapie en vergrote levensverwachting. Daardoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Hartfalen is in Nederland een belangrijke oorzaak van overlijden. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

Proefopzet en haalbaarheid

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

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

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 beoordeling toe. Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).

De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe. **N.V.T.**
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 richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt F in de bijlagen.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2).

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door: De experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven. Vrijwel alle dieren worden aan het eind van de proef opgeofferd.

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 beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

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. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat.

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 beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

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. Licht uw beoordeling toe.

Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

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. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*; zie *bijlage I* voor voorbeeld).

De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. De DEC-UM is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om in voorkomende gevallen de proeven met dieren van eenvormig geslacht uit te voeren.

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 richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

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

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

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het verkrijgen van nieuwe fundamentele inzichten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van (metabool) hartfalen, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen?"

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.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *matig tot ernstig nadeel.*

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Algemeen: *relevante groei van medische kennis.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van hartpatiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven grotendeels tot de dood na verschillende categorieën van ongerief: licht ongerief/matig ongerief/ernstig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot uitbreiding van de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van (metabool) hartfalen. Deze kennis is op dit moment nog beperkt, maar deze kennis is wel noodzakelijk voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden van hartfalen. In de kliniek is bij metabool hartfalen behoefte aan meer kennis en effectievere therapie. Hierdoor kan de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Metabool hartfalen (HfpEF) komt veel voor. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag.

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over nieuwe fundamentele inzichten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van (metabool) hartfalen, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen?" bevestigend.

Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie en gedurende het project blijven de onderzoekers zich daarvan vergewissen.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning.

De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel Niet-coderende RNA moleculen en het metabole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is **unaniem** tot stand gekomen.

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*).

N.V.T.

Daarenboven is de DEC-UM niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD107002017924

Bijlagen

2

Datum 13 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 maart 2017. Het gaat om uw project "Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002017924. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

13 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017924

Datum:
13 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017924

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 april 2017
Geplande einddatum: 1 april 2022
Titel project: Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen
Titel niet-technische samenvatting: Rol van nieuwe genen in de ontwikkeling van hartfalen
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD Maastricht
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.684,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Maastricht
Datum: 13 maart 2017

Datum:
13 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017924



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD107002017924

Bijlagen

2

Datum 13 maart 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 13 maart 2017

Vervaldatum: 12 april 2017

Factuurnummer: 170924

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002017924	€ 1.684,00

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

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD107002017924

Datum 22 maart 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen" met aanvraagnummer AVD107002017924. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

- 1) U beschrijft het ongerief van de dieren die zonder voorbehandeling worden gedood als terminaal, dit is niet correct. Wanneer de dieren eerst gedood worden en pas daarna de organen verwijderd worden wordt dit gezien als licht ongerief. Kunt u dit in de bijlages dierproeven en de Niet Technische Samenvatting aanpassen? Indien eerst organen/cellen worden geïsoleerd en de dieren pas daarna worden gedood graag zo in de aanvraag vermelden.
- 2) U beschrijft in de bijlage dierproeven 1 onder K. dat de moeders licht ongerief ondervinden. Zou het niet mogelijk zijn om 1-2 pups bij de moeder in het nest achter te laten zodat ze geen extra ongerief ervaren? Dan zouden deze dieren niet als dierproef worden gezien. Kunt u in overleg met de IvD vaststellen of de moederdieren inderdaad drempel overschrijdend ongerief zullen ondervinden?
- 3) In bijlage dierproeven 1 schrijft u op pagina 1 onder A., Volwassen rat

cardiale myocyten: 'Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncubeerd.' Op pagina 2 onder B., Volwassen rat cardiale myocyten staat: 'Wij hebben gekozen om alleen experimenten te doen met mannelijke ratten om daarmee de effecten van estrogeen uit te sluiten.' Zou u de bijlage willen aanpassen met de juiste informatie?

Datum:
22 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017924

4) In de NTS staat dat 2832 ratten worden ingezet waarvan 720 volwassen ratten. Echter komen we op 2952 ratten waarvan 840 (600+240) volwassen ratten uit bijlage 1. Zou u het aantal volwassen ratten willen nakijken en aanpassen?

Leges

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

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



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 Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Universiteit Maastricht

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD107002017924

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:

22 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017924

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

24 APR 2017

Aan: **Centrale Commissie Dierproeven**
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Uw kenmerk

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht

05-04-2017

Betreft: *Reactie op Uw schrijven dd.29-03-2017/PV AVD107002017924.*

Geachte [REDACTED], geachte Commissie,

In reactie op Uw brief van 29 maart j.l. hebben wij de beschrijving van het ongerief van de dieren gespecificeerd in zowel het projectvoorstel als de betreffende bijlagen 3 en 4.

In het projectvoorstel leest dit nu als volgt:

Peri-operatieve pijnbestrijding wordt altijd toegepast volgens de GV SOLAS richtlijnen. Echter, omdat NSAID's en opioïden interfereren met ontsteking, zal in geval dat ontsteking een primaire uitkomstmaat is, in de laatste week van de studie afgeweken worden van de GV SOLAS richtlijnen in geval pijnbestrijding om andere redenen geïndiceerd is, bijvoorbeeld vanwege een ontstoken wondje. In dat geval worden dieren waar nodig voortijdig opgeofferd volgens het protocol, waarbij alle primaire uitkomstparameters worden bepaald. Ontstoken wondjes treden zelden op, in max ±1% van de dieren.

In de bijlagen 3 en 4 leest dit nu als volgt:

*In geval de dieren een operatie ondergaan (minipompimplantatie, TAC of MI) krijgen de dieren peri-, per- en post-operatieve analgesie volgens geaccepteerde richtlijnen zoals GV SOLAS. Alle dieren worden intensief gemonitord en bij afwijkend gedrag wijzend op pijn of ontsteking zal gepaste pijnstilling/ontstekingsremming worden ingezet. In het geval een van de primaire uitkomstparameters "ontstekingsrespons" is en het afwijkende gedrag wordt geobserveerd in de laatste week van de studie, zal **geen** pijnstilling/ontstekingsremming worden toegepast; in dit geval wordt het dier voortijdig opgeofferd volgens het protocol, waarbij alle primaire uitkomstparameters worden bepaald.*

Secretariaat

Bezoekadres

Maastricht

Postadres

 Postbus 616
 6200 MD Maastricht

Aan documenten waarin wijzigingen zijn aangebracht is in de titel 'R3' toegevoegd. De wijzigingen zijn grijs gemarkeerd.

Hoogachtend,

A large black rectangular redaction box covers the majority of the page content below the salutation. It starts below the word 'Hoogachtend,' and extends downwards and to the right, obscuring the name and any other text that might have been present.



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.
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.

Metabool hartfalen, een complex ziektebeeld

Metabool hartfalen

Hartfalen met een behouden ejectie fractie, ook wel HFpEF en metabool hartfalen genoemd, is een groeiend klinisch en maatschappelijk probleem dat voortvloeit uit de risicofactoren horend bij een moderne levensstijl, samenvattend het metabole syndroom. Een kwart van de wereldpopulatie lijdt aan het metabole syndroom, waarbij de meerderheid een combinatie heeft van type 2 diabetes, obesitas en hypertensie, ook wel "diabetesotensie" genoemd (Sharabi 2012). De 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan de morbiditeit en mortaliteit van het metabole syndroom zijn 1) **microvasculaire (endotheel) dysfunctie**, 2) **ontsteking**, 3) **cardiomyocyt hypertrofie**, 4) **metabole veranderingen in cardiomyocyten en ontstekingscellen** ten gevolge van o.m. insuline resistentie en hypertensie, en eindorgaanschade met 5) **bindweefselafzetting/fibrose** in bijvoorbeeld het hart (Aroor 2013, Schroen 2012). Deze 5 pathofysiologische processen leiden uiteindelijk tot hartfalen, waarbij er hoofdzakelijk hartfalen met behouden ejectiefractie (HFpEF) ofwel "metabool hartfalen" wordt gezien (Paulus 2013). Een van de belangrijkste kenmerken van HFpEF is diastolische dysfunctie, oftewel een stijf hart dat moeilijk ontspant (Paulus 2013).

Immuunsysteem

In welke mate het immuunsysteem en externe pathogenen bijdragen aan hartfalen al dan niet in combinatie met bovenstaande risicofactoren is nog onbekend. Recent vond onze groep dat virale aanwezigheid in het hart, van relatief onschuldige verkoudheids- en enterovirussen zoals parvovirus B19 en coxsackievirus B3, in combinatie met andere risicofactoren de prognose van hartfalen patiënten verslechtert (Hazebroek 2015).

Ook is de overleving en hartfunctiebehoud na een myocardinfarct steeds beter door betere en snellere behandelingen. Echter, de 5 pathofysiologische processen van HFpEF spelen in het hart na het overleven van een myocardinfarct ook een centrale rol, en ook hier is het onbekend wat de interactie is tussen het geactiveerde immuunsysteem na een myocardinfarct en de aanwezigheid van diabetesotensie. Zowel de infectie met relatief onschuldige virussen als het overleven van een myocardinfarct kunnen als additionele risicofactoren voor hartfalen worden beschouwd, waarbij immunosuppressie mogelijk een belangrijke rol speelt.

Helaas kan de cardioloog een patiënt met HFpEF – in tegenstelling tot iemand met hartfalen met verlaagde ejectiefractie – geen effectief geneesmiddel aanbieden, waardoor de levenskwaliteit van HFpEF patiënten sterk verlaagd wordt en de mortaliteit wereldwijd exponentieel toeneemt met de groeiende obese en oudere populatie (Nanayakkara S 2015, Horgan 2014). Om een betere behandeling van HFpEF mogelijk te maken is er kennis nodig van de onderliggende pathofysiologische en moleculaire processen, waaronder de (relatieve) bijdragen en interacties van bovengenoemde 5 processen in de diverse organen en systemen die aangedaan zijn tijdens het metabole syndroom, zoals hart, lever, nieren, longen, het zenuwstelsel, het vetweefsel, de pancreas en de skeletspieren.

Huidige stand van zaken

Het is bekend dat de 5 pathofysiologische processen die hierboven beschreven staan, allen bijdragen aan de ontwikkeling van HFpEF. Echter, de (combinatie van) risicofactoren die bijdragen aan de ziekte verschillen per patiënt. Het falen van de vele klinische trials waarbij HFpEF als 1 ziekte werd beschouwd (Nanayakkara 2015), onderstreept het belang van patiënten stratificatie om te komen tot effectieve behandelwijzen met "therapie-op-maat". De cardioloog heeft te maken met 2 problemen: 1) wat is de impact van de diverse risicofactoren en hiermee gepaard gaande pathofysiologische processen op het ziekteverloop in HFpEF patiënten?, en 2) welke therapie-op-maat kan worden aangeboden? Er is grote behoefte aan nieuwe therapeutische targets, die er alleen kunnen komen als er meer inzicht komt in de onderliggende mechanismen (Nanayakkara 2015). Dit project heeft als doel meer inzicht te verkrijgen in de moleculaire processen betrokken bij de pathofysiologische mechanismen van HFpEF en daarmee nieuwe therapeutische targets te identificeren. Onze groep maakt zich daarnaast sterk om de HFpEF patiëntenpopulatie te helpen stratificeren in samenwerking met cardiologen, radiologen en fysiologen.

Schematisch

Diabetesotensie/ metabool syndroom ± immunosuppressie >>> pathofysiologische mechanismen (in

willekeurige volgorde: cardiale microvasculaire dysfunctie, ontsteking, cardiomyocyt hypertrofie, metabole veranderingen in cardiomyocyten en ontstekingscellen, en bindweefselvorming) >>> HFpEF/metabool hartfalen

Niet-coderende RNA moleculen spelen belangrijke rollen in pathofysiologische processen

De helft van het zoogdierengenoom bestaat uit niet-eiwit-coderende genen. De hieruit voortkomende niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs" (lncRNAs), spelen een rol in alle (patho)biologische processen, ook in processen die leiden tot hartfalen (Schroen 2012). Recent heeft ons lab bijvoorbeeld aangetoond dat het niet-coderende [REDACTED] tijdens hypertensie de ontstekingsrespons van het hart controleert en bijdraagt aan de ontwikkeling van humaan en muis hartfalen (Heymans 2013). Ook zijn specifieke lncRNAs gevonden met een role in humaan en muis hartfalen (Ounzain 2015). Echter, de rol van niet-coderende RNA moleculen, waaronder [REDACTED], in de 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan HFpEF is grotendeels onbekend. Om te komen tot nieuwe inzichten in de moleculaire processen betrokken bij de pathofysiologische mechanismen van HFpEF en de identificatie van nieuwe therapeutische targets, zal dit project zich daarom richten op de rol van niet-coderende RNA moleculen.

Translationeel potentieel:

Niet-coderende RNA moleculen vormen een even grote groep genen als de eiwit-coderende genen. Niet-coderende RNA moleculen zijn relatief makkelijk te remmen met specifieke medicijnen (bv "antagomirs"), waarvoor de eerste klinische trials al lopen. Het feit in aanmerking nemend dat voor de grote en groeiende groep HFpEF patiënten nog geen therapie beschikbaar is, biedt het exploreren van de rol en mogelijkheden van deze grote groep genen een ongekend therapeutisch potentieel.

Relevante referenties:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Sharabi Y. Management of the unholy trinity diabetes-obesity-hypertension (diabesotension). Diabetes/metabolism research and reviews 2012
 - Aroor AR, McKarns S, Demarco VG, Jia G, Sowers JR. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. Metabolism: clinical and experimental. 2013;62:1543-1552
 - Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. J Am Coll Cardiol. 2013;62:263-271
 - Nanayakkara S, Kaye DM. Management of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Review. Clin Ther. 2015 Oct 1;37(10):2186-98.
 - Horgan S et al. Murine Models of Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. Journal of Cardiac Failure. 2014 Dec;20(12):984-95
 - Patel BM, Mehta AA. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. European journal of pharmacology. 2012;697:1-12
 - Schroen B, Heymans S. Small but smart--micrornas in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing. Cardiovascular research. 2012;93:605-613
 - Hazebroek MR, Moors S, Dennert R, van den Wijngaard A, Krapels I, Hoos M, Verdonschot J, Merken JJ, de Vries B, Wolffs PF, Crijns HJ, Brunner-La Rocca HP, Heymans S. Prognostic Relevance of Gene-

Environment Interactions in Patients With Dilated Cardiomyopathy: Applying the MOGE(S) Classification. *J Am Coll Cardiol.* 2015 Sep 22;66(12):1313-23

- Ounzain S, Micheletti R, Beckmann T, Schroen B, Alexanian M, Pezzuto I, Crippa S, Nemir M, Sarre A, Johnson R, Dauvillier J, Burdet F, Ibberson M, Guigó R, Xenarios I, Heymans S, Pedrazzini T. Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs. *Eur Heart J.* 2015 Feb 7;36(6):353-68a.

[Redacted text block]

- Samir Ounzain, Rudi Micheletti, Tal Beckmann, Blanche Schroen, Michael Alexanian, Iole Pezzuto, Stefania Crippa, Mohamed Nemir, Alexandre Sarre, Rory Johnson, Jerome Dauvillier, Frederic Burdet, Mark Ibberson, Roderic Guigo, Ioannis Xenarios, Stephane Heymans, Thierry Pedrazzini. Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs. **Eur Heart J.** 2015 Feb 7;36(6):353-68a.

- Respress JL1, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, Voigt N, Lawrence WS, Skapura DG, Skårdal K, Wisløff U, Wieland T, Ai X, Pogwizd SM, Dobrev D, Wehrens XH. Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. **Circ Res.** 2012 May 25;110(11):1474-83.

-Orlando F. Bueno, Leon J. De Windt, Hae W. Lim, Kevin M. Tymitz, Sandra A. Witt, Thomas R. Kimball, Jeffery D. Molkenin. The Dual-Specificity Phosphatase MKP-1 Limits the Cardiac Hypertrophic Response In Vitro and In Vivo. **Circ Res** 2001;88:88-96.

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 **doel** van het project is om de rol van niet-coderende RNA moleculen in hartweefselfalen te onderzoeken in cel- en muizenmodellen van diabetes, obesitas en/of hypertensie (diabesotensie/metabool syndroom). Niet-coderende RNA moleculen kunnen buiten het hart ook processen in het lichaam beïnvloeden die tot hartfalen leiden, zoals de functie van de perifere vaten.

De wetenschappelijke **hypotheses** die in dit PV worden getoetst zijn:

Niet-coderende RNA moleculen dragen bij aan de ontwikkeling van hartfalen ten gevolge van het metabole syndroom door

- 1) en 2) Het reguleren van cardiomyocyt functie, waaronder 1) hypertrofie (celgroei) en 2) cel metabolisme, tijdens diabetes, obesitas, hypertensie, en/of virale aanwezigheid;
- 3) Het reguleren van microvasculaire functie tijdens diabetes, obesitas, hypertensie, en/of virale aanwezigheid;
- 4) Het reguleren van ontstekingsresponsen tijdens diabetes, obesitas, hypertensie, en/of virale aanwezigheid;
- 5) Het reguleren van bindweefselvorming in het hart tijdens diabetes, obesitas, hypertensie, en/of virale aanwezigheid.

Samenhang tussen hypothesen a-d

De 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen, en die worden aangeschakeld door de risicofactoren horend bij het metabole syndroom, beïnvloeden elkaar. Microvasculaire dysfunctie en ontsteking hebben een wisselwerking op elkaar; het door het metabole syndroom geactiveerde endotheel trekt ontstekingscellen aan, en op zijn beurt verhoogt ontsteking de permeabiliteit van de vaten. Tegelijkertijd verlaagt microvasculaire dysfunctie de toevoer van voedingsstoffen en zuurstof naar de cardiomyocyt, leidend tot cardiomyocyt dysfunctie. Cardiomyocyt dysfunctie en ontsteking worden verergerd door verhoogde activatie van het renine-angiotensine-aldosteron systeem en het veranderde aanbod van circulerende suikers en vetzuren tijdens diabetes, en leiden tot apoptose van diverse celtypen en bindweefselvorming.

De **haalbaarheid** van het project wordt ondersteund door:

- a. De beschikbaarheid van diverse cel- en muizenmodellen van hartfalen binnen het instituut.
- b. De toegang tot fenotyperingsapparatuur en -expertise binnen het instituut, alsook de gevestigde moleculaire infrastructuur.
- c. De moleculaire en pathofysiologische achtergrond van de PI en haar integratie in de kliniek (staflid).

De beschikking over subsidiegelden van de PI die aan het doel van dit project besteed dienen te worden, en de expertise van de PI met diermodellen.

3.3 Belang

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

Hartfalen is een progressieve en ernstig invaliderende aandoening met een slechte prognose waarvoor geen therapie beschikbaar is anders dan symptoombestrijding. Volgens statistieken van de Nederlandse Hartstichting en het RIVM leven er in Nederland zo'n 200.000 mensen met hartfalen, waarvan de helft HFpEF heeft. De helft van de patiënten overlijdt binnen 5 jaar na diagnose, waarbij er voor de HFpEF populatie geen effectieve behandeling voorhanden is. Risicofactoren voor de ontwikkeling van HFpEF zijn hoge bloeddruk, (pre-)diabetes en obesitas. Veel patiënten hebben een combinatie van deze risicofactoren (diabetes), maar zelden worden de risicofactoren tezamen bestudeerd. Tevens is over de progressie van prediabetes naar vergevorderd diabetes niet veel bekend, daarom worden modellen bestudeerd. Deze fundamentele en translationele studie zal bijdragen aan de opheldering van de mechanismen die leiden tot HFpEF, door de combinatie van hoge bloeddruk, (pre-)diabetes en obesitas als uitgangspunt te nemen, en de rol van niet-coderende RNA moleculen te bestuderen die in deze condities geïmpliceerd zijn. Op termijn hopen we met de vergaarde kennis te helpen voorkomen dat mensen hartfalen ontwikkelen danwel hieraan overlijden. Dit is zowel sociaal als economisch van grote maatschappelijke relevantie.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

1) Kandidaatgenen

Uit diverse reeds gecompleteerde screens voor identificatie van niet-coderende RNA moleculen betrokken bij processen die hartfalen beïnvloeden, zijn kandidaat moleculen voor *in vivo* bestudering geselecteerd:

- *in vitro* screen van 194 microRNAs, waarbij deze tot overexpressie zijn gebracht in cardiomyocyten, bindweefselcellen en ontstekingscellen (Verjans et al. ingediend). De readouts

van de respons van de cellen op de verhoogde expressie van de microRNAs zijn gerelateerd aan aspecten van de ontwikkeling van hartfalen, respectievelijk celgroei, bindweefselvorming en ontstekingsrespons.

- Microarray resultaten van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in humane hartbiopten van mensen met hartfalen (waaronder HFpEF (ongepubliceerd) en viraal hartfalen (zie Corsten et al. Circ Res 2012)) en gezondere controles.
- Deep sequencing resultaten (ongepubliceerd) die expressie tonen van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in een ratten model van HFpEF.
- Microarray resultaten van niet-coderende RNA moleculen, waaronder microRNAs en "long non-coding RNAs", in muizenmodellen van hartfalen (TAC, Angiotensine II en viraal hartfalen, zie bijvoorbeeld Cortsen et al. Circ Res 2012 en Ounzain et al. 2015).

We beschikken op dit moment over een lijst van **60 kandidaatgenen** die afkomstig zijn uit deze bestaande datasets. Voor deze eerste stap van het onderzoek zijn derhalve geen dierproeven nodig. Deze 60 kandidaatgenen zullen in stap 2) *in vitro* gevalideerd worden.

2) Validatie in historische samples en in *in vitro* modellen

Geselecteerde niet-coderende RNA kandidaten zullen **gevalideerd** worden in

- a) reeds verzamelde monsters van muizenharten, rattenharten en humane hartbiopten middels
 - a. expressie-analyses
 - b. geoptimaliseerde histologische en *in vitro* technieken (zie bvb Heymans 2013) ter bepaling van de bron van expressie (celtype)
Voor deze stap wordt gebruik gemaakt van historische monsters en zijn geen proefdieren nodig.
- b) de geïdentificeerde cellen van oorsprong ter bepaling van de moleculaire processen waarbij deze kandidaten betrokken zijn. Hiertoe worden cellen geïsoleerd uit proefdieren.

De te bestuderen moleculaire processen betrokken bij de ontwikkeling van hartfalen/HFpEF en gerelateerd aan de 5 beschreven pathofysiologische processen zijn:

1. hypertrofie van cardiomyocyten
2. cardiomyocyt metabolisme
3. endotheelcel proliferatie en functie
4. ontstekingsparameters in elk cardiaal celtype, met name cardiomyocyten, endotheel- en ontstekingscellen
5. bindweefselvorming door fibroblasten

De bron van de te gebruiken cellen is deels cellijnen (cardiomyocyten, endotheelcellen, fibroblasten, ontstekingscellen), maar gezien de grote gevolgen van immortalisatie van deze cellen op hun metabolisme en groei in deze cellen (zie bvb Monge et al. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Apr;87(4):318-26. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes) – processen die tijdens hartfalen een primaire rol spelen - is het van belang de processen ook in de volgende primaire cellen te bestuderen:

- Neonatale rat cardiomyocyten > bestudering van celgroei (oorsprong: wild type)
- Adulte rat cardiomyocyten > bestudering van metabolisme (oorsprong: wild type op controle dieet of hoog vet dieet)
- Neonatale rat cardiale fibroblast > bestudering van bindweefselvorming (oorsprong: wild type)
- Beenmergcellen geïsoleerd uit de muis die *in vitro* worden gedifferentieerd tot macrofaag > bestudering van ontstekingsrespons (oorsprong: wild type en transgene muizen)

NB. Het gebruik van neonatale cellen voor de bestudering van "volwassen" hartfalen processen heeft voor- en nadelen. Voordeel is dat hartfalen in feite deels een herprogrammering van cardiomyocyten is richting neonatale genexpressie, wat dit model zeer representatief maakt. Aan de andere kant zijn deze cellen nooit volwassen geweest, dus ondergaan geen herprogrammering. Neonatale hartspiercellen zijn door hun relatieve toegankelijkheid (gemak van isolatie) en gemak om mee te kweken het meest gebruikte en geaccepteerde *in vitro* model



* hoog vet dieet veroorzaakt pre-diabetes.

**Hoewel TAC een acuut model van drukoverbelasting is, in tegenstelling tot een meer progressief verloop in mensen, reproduceert het model meerdere pathofysiologische processen die ook in de mens plaatsvinden, inclusief hypertrofie en diastolische dysfunctie (Monnet et al. Ann Thorac Surg 2005; Horgan et al. Journal of Cardiac Failure 2014; Respress et al. Circ Res 2012).

***Phenylephrine wordt gebruikt als model voor acute drukoverbelasting, voor het aanschakelen van immediate early genes en signaleringspaden in cardiomyocyten (Bueno et al. Circ Res 2001;88:88-96).

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.

Algemene doelstelling

De algemene doelstelling van het project is nieuwe therapeutische targets te vinden voor de behandeling van HFpEF. Als strategie is gekozen allereerst kandidaatgenen die uit bestaande datasets komen te manipuleren in relevante celmodellen *in vitro*. Op basis van de rol die dan gevonden wordt voor een bepaald kandidaatgen, wordt een keuze gemaakt voor het *in vivo* muizenmodel: AngII infusie of TAC, eventueel in combinatie met hoog vet dieet (als de kandidaat ook een rol heeft in metabolisme), of CVB3 infectie. Als uit een eerste *in vivo* experiment blijkt dat het kandidaatgen een rol heeft in pre-diabetes (AngII/TAC en hoog vet dieet), wordt een tweede *in vivo* experiment uitgevoerd met een ander muizenmodel van diabetes tensie dat een meer gevorderd stadium van diabetes onderzoekt: diabete $db^{-/-}$ muizen in combinatie met drukoverbelasting door AngII infusie of TAC.

Samenhang tussen onderdelen

De samenhang tussen de beschreven dierproeven wordt bepaald door de samenhang tussen de 5 pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan hartfalen. Deze 5 processen vinden altijd in combinatie met elkaar plaats tijdens de ontwikkeling van hartfalen. Echter, hun individuele bijdrage

verschilt afhankelijk van de betrokken risicofactoren. Bijvoorbeeld, bij enkel hypertensie als onderlegger zijn er relatief minder metabole veranderingen in het hart, en bij enkel diabetes of obesitas is er relatief minder cardiomyocyt hypertrofie en bindweefselvorming in het hart. In aanwezigheid van een virus of na een myocardinfarct zal de ontstekingsrespons het sterkst zijn. Het manipuleren van kandidaatgenen die op 1 of meer van de 5 processen aangrijpen, maakt het mogelijk de mate van causale betrokkenheid bij hartfalen van deze processen in kaart te brengen, en maakt het tegelijkertijd mogelijk om nieuwe therapeutische targets te identificeren. Om die reden zal voor elk kandidaatgen eerst de betrokkenheid bij de 5 processen in kaart worden gebracht middels *in vitro* experimenten die de 5 processen artificieel uit elkaar trekken, en vervolgens zal op basis van de resultaten een *in vivo* model gekozen worden dat de gevonden betrokken processen het best representeert (**Tabel 2**).

Tabel 2.

Keuzemomenten en go/no-go momenten:

- 1) Validatie van de expressie van kandidaatgenen in historische samples: van 60 naar 20 kandidaatgenen. Van deze 20 gekozen kandidaatgenen worden in deze stap het celtype/bron van expressie bepaald, zodat *in vitro* validatie experimenten in stap 2 gericht op relevante celtypen kunnen worden opgezet.
In deze eerste stap, die enkel gebruik maakt van historische samples, komen we dus tot 20 kandidaatgenen voor bestudering in nieuwe proefdierexperimenten.

- 2) validatie in *in vitro* modellen middels manipulatie van de individuele kandidaatgenen in hun celtype van oorsprong: wordt er een rol gevonden van het kandidaatgen in cellulaire readouts van een van de 5 pathofysiologische processen betrokken bij hartfalen? Hierbij wordt gebruik gemaakt van zowel cellen uit neonatale dieren, die met name celgroei reflecteren, als cellen uit adulte dieren, die celmetabolisme en productie van bvb bindweefsel reflecteren.

- *Go/no-go moment:* -

Ja > verfijning van hypothese en verder met stap 3.

- Kandidaatgenen die een rol hebben in cardiomyocyt en/of microvasculaire dysfunctie zullen in stap 3 worden onderzocht in een muismodel van drukoverbelasting, cardiomyocyt en microvasculaire dysfunctie door TAC, al dan niet in combinatie met hoog vet dieet.
- Kandidaatgenen die een rol hebben in fibrose en/of ontsteking zullen in stap 3 worden onderzocht in muismodellen van drukoverbelasting, fibrose en ontsteking door AngII, al dan niet in combi met hoog vet dieet.

Nee > stop.

- 3) validatie in *in vivo* model: heeft het kandidaatgen een rol in hartfalen? Hiertoe zal het

kandidaatgen in een diermodel van hartfalen worden gemanipuleerd, al dan niet in combinatie met hoog vet dieet. Keuze van diermodel(len) wordt bepaald door de verfijnde hypothese uit stap 2. Wordt er een rol gevonden van het kandidaatgen in de ontwikkeling van hartfalen/HFpEF?

- *Go/no-go moment*: -

Ja > verfijning van de hypothese en nieuw dierexperiment met andere oorzaak leidend tot hartfalen. De verwachting is dat de meeste kandidaatgenen (16 van de 20) een rol blijken te hebben in hartfalen; uit onze ervaring blijkt dat de *in vitro* validatie stap een optimale keuze van kandidaatgenen mogelijk maakt.

Nee > stop.

- 4) Tweede validatiestap in *in vivo* model(len): heeft het kandidaatgen een rol in een ander model van hartfalen, en welke? In deze stap zullen we de rol van het kandidaatgen in een ander model van hartfalen bepalen, alsook inzoomen op het celtypen waarin het kandidaatgen een rol speelt, en de vroege kandidaatgen-afhankelijke processen die betrokken zijn tijdens de ontwikkeling van hartfalen.
- 5) Valorisatie: plannen van vervolgstappen om kandidaatgen richting therapeutische toepassing te sturen. Hieronder vallen patentering, samenwerking opstarten met farmaceutische industrie voor financiering van experimenten in grotere proefdieren, publicatie, en uiteindelijk klinische trials.

Voorbeeld 1: uit stap 1) komt dat het kandidaatgen hoog tot expressie komt in hypertrofe harten en in historische cardiomyocytmonsters. In stap 2) zullen daarom neonatale rat cardiomyocyten gebruikt worden voor het bestuderen van celgroei responsen na manipulatie van het molecuul, en adulte rat cardiomyocyten voor het bepalen van metabole effecten na manipulatie van het kandidaatgen. Er zal gebruik worden gemaakt van adulte ratten die op een controle dieet hebben gestaan, of die zijn blootgesteld aan een hoog vet dieet.

Uit stap 2) komt dat het molecuul een rol heeft in cardiomyocyt metabolisme. Daarom zal in stap 3) het molecuul worden gemanipuleerd in een pre-diabetes model van muizen met hoogvetdieet en drukoverbelasting door TAC. Aan het einde van het experiment zal de hartfunctie van het dier in kaart worden gebracht (een van de twee primaire uitkomstparameters, naast cardiomyocyt dysfunctie), waarna het geexplanteerde hart onderworpen wordt aan uitgebreide moleculaire, cellulaire en histologische analyses die voor muis zijn opgezet en een beeld zullen geven van de moleculaire processen waarin het kandidaatmolecuul een rol heeft.

Als er een rol gevonden wordt voor het kandidaatgen in hartfalen, zal het kandidaatgen vervolgens in stap 4) op maximaal 4 manieren worden onderzocht: a) manipulatie in een tweede muizenmodel van diabetes/drukoverbelasting, namelijk in drukoverbelaste $db^{-/-}$ muizen; b) herhaling van TAC met hoogvetdieet voor het isoleren van cellen uit het hart (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken); c) korterdurend experiment met TAC en hoogvetdieet voor het bepalen van celresponsen (vroege cellulaire en moleculaire processen inclusief cardiomyocyt hypertrofie, cardiomyocyt metabolisme, ontstekingsrespons, endotheeldysfunctie) voorafgaand aan hartfalen; en d) acute PE injectie voor het bepalen van de "immediate early" responsen in het hart (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken).

Voorbeeld 2: uit stap 1) komt dat het kandidaatgen hoog tot expressie komt in virale myocarditis en in historische beenmergmacrophage monsters. In stap 2) zullen daarom beenmergcellen gebruikt worden voor het bestuderen van inflammatoire responsen na manipulatie van het kandidaatgen.

Uit stap 2) komt dat het kandidaatgen een rol heeft in macrofagen. Uit onze ervaring blijkt dat dit soort genen vaak zowel in virale myocarditis als in ontstekingsprocessen bij drukoverbelasting een rol speelt (bv macrofaag XXXXXXXXXX heeft een rol in zowel drukoverbelasting (Corsten et al. Circ 2013) als in virale myocarditis (Heymans et al. Circ Res 2012)). Daarom zal in stap 3) het gen worden gemanipuleerd in een model van drukoverbelasting door Angiotensine II met als primaire uitkomstparameter hartfunctie. Als er een rol wordt gevonden voor het kandidaatgen in hartfalen, zal het vervolgens in stap 4) op maximaal 5 manieren worden onderzocht: a) manipulatie in een tweede muizenmodel van diabetes/drukoverbelasting, namelijk in drukoverbelaste $db^{-/-}$ muizen; b) herhaling van het eerdere AngII experiment voor het

isoleren van cellen uit het hart (een manier om de andere primaire uitkomstparameter, cardiomyocyt dysfunctie, te onderzoeken); c) korterdurend experiment met AngII voor het bepalen van celresponsen (vroeg cellulaire en moleculaire processen inclusief cardiomyocyt hypertrofie, cardiomyocyt metabolisme, ontstekingsrespons, endotheeldysfunctie) voorafgaand aan hartfalen; d) virale myocarditis door CVB3 infectie met hoogvetdieet voor de bestudering van de ontstekingsrespons onder pathogene en metabole condities (een manier om de andere primaire uitkomstparameter, ontsteking, te onderzoeken); en e) myocardinfarct met hoogvetdieet voor de bestudering van de ontstekingsrespons onder steriele pro-inflammatoire en metabole condities (een andere manier om de primaire uitkomstparameter, ontsteking, te onderzoeken).

Keuzemomenten schematisch (besluitmodel):



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

Volgnummer	Type dierproef
1	Isolatie van neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten en adulte rat cardiale myocyten
2	Isolatie van beenmergcellen uit muizen
3	Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen
4	Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene $db^{-/-}$ muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen

5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1-R2	Isolatie van neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten en adulte rat cardiale myocyten

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Er zal gebruik worden gemaakt van neonatale (0-3 dagen oud) ratten, deze zullen direct voor de isolatie worden opgeofferd. Hiervoor zullen drachtige moeder ratten extern worden besteld. Voor de moederdieren zal na het werpen een ander doel worden gezocht. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncubeerd.

Volwassen rat cardiale myocyten

Er zal gebruik worden gemaakt van wild type ratten, eventueel in combinatie met hoog vet dieet. Deze zullen direct voor de isolatie op humane wijze worden opgeofferd. ~~Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncubeerd.~~ Omdat estrogene de uitkomstparameter, celmetabolisme, beïnvloeden, worden alleen mannelijke dieren geïncubeerd. De keuze voor volwassen dieren wordt gemaakt op het moment dat een kandidaat molecuul een rol heeft in het metabolisme van de cardiomyocyt, omdat 1) deze uitleesparameter in cellijnen en in neonatale cellen niet of beperkt te meten is, en 2) een volwassen dier langere tijd blootgesteld kan worden aan metabole parameters in de circulatie, zoals een hoog vet dieet. Een hoog vet dieet induceert een pre-diabetische status in ratten en dit maakt het mogelijk om de chronische effecten van verhoogd circulerend insuline, glucose en vetzuren op cardiomyocyt metabolisme 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.

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

De neonatale dieren worden direct voor de isolatie opgeofferd. Voor de moederdieren zal na het werpen een

ander doel worden gezocht. De dieren ondergaan geen behandelingen.

Volwassen rat cardiale myocyten

Volwassen ratten ondergaan ofwel geen behandeling, of ze krijgen een hoog vet dieet gedurende maximaal 24 weken, of een gematcht synthetisch controle dieet, een "normaal vet dieet". De dieren worden direct voor de celisolatie op humane wijze opgeofferd.

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

In ons lab en binnen het onderzoeksinstituut CARIM hebben we reeds een ruime ervaring met isoleren van primaire harspieren en met het gebruik van deze cellen voor experimenten (zie bijvoorbeeld Corsten et al. Eur Heart J 2015; Heymans et al. Circulation 2013; van Almen et al. Ageing Cell 2012, Corsten et al. Circ Res 2012). Statistiek is moeilijk toepasbaar op dit soort experimenten met kleine groepsgrootten; onze ervaring is dat 4 biologische replicaten per groep een goed beeld geeft.

B. De dieren

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

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Er zal gebruik worden gemaakt van neonatale (0-3 dagen oud) rattenpups. Hiervoor zullen drachtige moeder ratten worden besteld.

Ter bestudering van een kandidaat niet-coderend RNA molecuul bekijken we effecten op 3 experimentele readouts: genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie, respectievelijk, waarvoor om technische redenen verschillende monsters nodig zijn. Er zijn telkens 4 experimentele condities (controle ongestimuleerd, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie ongestimuleerd en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd). Per experimentele conditie zijn er 4 replicaten met 1 miljoen cellen per replicaat. Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom 3 (experimentele readouts) maal 4 (experimentele condities) maal 4 (replicaten) = 48 miljoen cellen nodig. Voor de validering van 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen hebben we daarom 60x48 miljoen cellen = maximaal 2.880 miljoen cellen nodig. Een optimale isolatie resulteert in 1.5 miljoen cellen per dier. Gebaseerd op bovenstaande berekening vragen wij toestemming voor het gebruik van **1920 dieren**. Voor de moederdieren gaan we uit van gemiddeld 10 pups per drachtige moeder. In totaal gaat het dan om **192** moederdieren.

Volwassen rat cardiale myocyten

Er zal gebruik worden gemaakt van volwassen ratten. Uit eerdere ervaringen met volwassen rat cardiomyocyten, in samenwerking met een andere onderzoeksgroep, is gebleken dat voor onze experimenten per rat voldoende cellen geïsoleerd worden voor 1 biologische replicaat met 4 experimentele condities, bijvoorbeeld controle sham, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie sham en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd. Vier biologische replicaten per groep van alle condities geven optimale statistiek en er zijn 3 experimentele readouts (genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie). Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom $3 \times 4 = 12$ ratten nodig.

-*Gezonde ratten*: Voor de validering van 50 van de 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen in gezonde ratten hebben we daarom nodig $50 \times 12 =$ maximaal **600 ratten**. De leeftijd van de volwassen ratten op het moment van isolatie is niet van invloed op de kwaliteit van de cardiomyocyten in gezonde condities van de rat.

-*Ratten op speciaal dieet*: Cardiomyocyten die geïsoleerd worden uit pre-diabetische ratten op hoog vet dieet en "normaal vet dieet"-gevoerde controle ratten, naar schatting voor de validering van 10 kandidaat niet-coderend RNA moleculen, zullen bij aanvang (start dieet) 2-4 maanden oud zijn. Hiervoor zijn 10 kandidaatgenen $\times 12$ ratten per gen $\times 2$ groepen = **240 ratten** benodigd, waarvan **120 ratten** een hoog vet dieet krijgen.

Estrogenen hebben een aanzienlijk effect op regulatie van glucose opname, GLUT4 translocatie, vetzuuropname en CD36 translocatie in het hart (Murphy E, Heart Fail Rev. 12: 293-300, 2007; Tepavcevic S, Horm Metab Res. 43: 524-30, 2011). Vanwege deze effecten van estrogenen kunnen de gegevens van beide sexen niet worden gecombineerd. Derhalve zou een gebruik van beide sexen een verdubbeling van de aantallen betekenen. Wij hebben gekozen om alleen experimenten te doen met mannelijke ratten om daarmee de effecten van estrogenen uit te sluiten.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

-Het gebruik van cellijnen is overwogen ter vervanging van de hier voorgestelde primaire cardiale cellen. Echter, de grote gevolgen van immortalisatie van deze cellen op hun differentiatiepotentieel, metabolisme en groei (zie bijvoorbeeld Monge et al. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Apr;87(4):318-26. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes)– processen die tijdens hartfalen een primaire rol spelen – maakt ze ongeschikt voor het bestuderen van de processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van hartfalen secundair aan het metabole syndroom, namelijk metabolisme, celgroei en –differentiatie.

-Het gebruik van organoiden zal in de toekomst overwogen worden, maar momenteel zijn er nog geen organoiden van het hart ten behoeve van het bestuderen van hartfalenprocessen beschikbaar.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Kennis die uit deze samples gehaald wordt kan de voorgestelde celexperimenten niet vervangen, omdat hiermee slechts naar expressiepatronen gekeken kan worden, en in de samples geen interventie meer mogelijk zijn. De historische samples zullen de benodigde (cel)experimenten wel verminderen, omdat ze het selecteren van kansrijke kandidaatgenen ondersteunen.

Vermindering:

-Tijdens 1 isolatie van neonatale ratten worden zowel cardiale myocyten als fibroblasten gekweekt. Beide celtypen zullen gebruikt worden voor experimenten. De celcultuur is geoptimaliseerd door ruime ervaring; er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd. Wanneer van te voren duidelijk is dat een geplande isolatie niet nodig is, zal deze tijdig geannuleerd worden.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Op basis van de kennis die uit deze samples gehaald wordt, wordt een keuze gemaakt voor het *in vitro* te bestuderen celtype. Zodoende worden onnodige celexperimenten voorkomen en het aantal dieren nodig voor celisolaties verminderd.

Verfijning: Het welzijn van de dieren wordt zo min mogelijk beïnvloed; de dieren ondergaan geen behandelingen of enkel een hoog vet dieet, dus geen invasieve behandelingen. Enkel wanneer er een indicatie is dat de beoogde kandidaat niet-coderend RNA moleculen een rol spelen in metabolisme, zal hun rol bestudeerd worden in cardiomyocyten van pre-diabetische ratten geïnduceerd door een hoog vet dieet. De cellen die uit de volwassen harten geïsoleerd worden zijn uitvoerig gekarakteriseerd binnen en buiten onze onderzoeksgroep, en er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd.

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 gaan niet in experiment maar worden op een zo humaan mogelijke wijze opgeofferd omwille van het gebruik van hun hart voor celisolaties.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

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?

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Moederdieren kunnen lichte stress ervaren

Volwassen rat cardiale myocyten

-Gezonde ratten: geen aantasting van welzijn verwacht.

-Ratten op speciaal dieet: De ratten die een hoog vet dieet gevoed krijgen ontwikkelen mogelijk huidproblemen, pre-diabetische symptomen zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte, polyurie/polydipsie en verminderde fysieke gezondheid. Het "normaal vet dieet" is gelijkaardig aan een regulier dieet, echter is net als het hoog vet dieet synthetisch met bekende samenstelling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Verstoring van nest

Volwassen rat cardiale myocyten

Het hoog vet dieet induceert een pre-diabetische staat in de rat.

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

Bij het bereiken van humane eindpunten zullen de dieren voortijdig worden opgeofferd.

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.

Bij gebrek aan ondernemingsgedrag, ernstige huidproblemen, immobiliteit en apathie zal een dier voortijdig worden opgeofferd.

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

0-5% van de dieren op een hoog vet dieet.

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.

Neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten

Neonatale ratten: licht

Moeder ratten: licht

Volwassen rat cardiale myocyten

Gezonde ratten: licht

Normaal vet dieet-gevoede ratten: licht

Hoog vet dieet-gevoede ratten: licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De neonatale en volwassen dieren worden gedood omdat hun hart volledig nodig is voor de isolatie van de cardiale cellen.

De moederdieren worden wanneer mogelijk in leven gehouden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2-R2	Isolatie van beenmergcellen uit muizen

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.

Er zal gebruik worden gemaakt van volwassen, wild type en transgene muizen, deze zullen direct voor de isolatie worden opgeofferd. Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden in het experiment geïncubeerd. De primaire uitkomstparameter is beenmerg isolatie tbv de isolatie van immuuncellen.

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.

Zowel de tibia's als de femurs zullen operatief verwijderd worden na euthanasie van de muis. Opeenvolgend worden na de uiteindes van de femurs en de tibias verwijderd zodat het beenmerg met een natuurlijke zoutoplossing uit de botjes kan worden gespoeld.

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

In ons lab hebben we reeds een ruime ervaring met isoleren van beenmergcellen uit muizen voor experimenten (zie bijvoorbeeld Corsten et al. Eur Heart J 2015; Corsten et al. Circ Res 2012). Statistiek is moeilijk toepasbaar op dit soort experimenten met kleine groeps grootten; onze ervaring is dat 4 replicaten per groep een goed beeld geeft.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van mannelijke en vrouwelijke muizen. Ter bestudering van een kandidaat niet-coderend RNA molecuul bekijken we effecten op 3 experimentele readouts: genexpressie, eiwitexpressie en celmorfologie, respectievelijk, waarvoor om technische redenen verschillende monsters nodig zijn. Er zijn telkens 4 experimentele condities (controle ongestimuleerd, controle "hartfalen"-gestimuleerd, genmanipulatie ongestimuleerd en genmanipulatie "hartfalen"-gestimuleerd). Per

experimentele conditie zijn er 4 replicaten met 1 miljoen cellen per replicaat. Voor elk kandidaat niet-coderend RNA molecuul zijn er daarom 3 (experimentele readouts) maal 4 (experimentele condities) maal 4 (replicaten) = 48 miljoen cellen nodig. Voor de validering van 60 kandidaat niet-coderend RNA moleculen hebben we daarom 60x48 miljoen cellen = maximaal 2.880 miljoen cellen nodig. Een optimale isolatie resulteert in 10 miljoen cellen per dier. Gebaseerd op bovenstaande berekening vragen wij toestemming voor het gebruik van **288 dieren**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

-Het gebruik van cellijnen is overwogen ter vervanging van de hier voorgestelde primaire beenmerg cellen. Echter, deze aanpak geeft de mogelijkheid om de polarisatie (richting pro- of anti-inflammatoire macrofaag) en differentiatie van de geïsoleerde beenmergcellen te reguleren en te bestuderen, en de rol van kandidaat moleculen hierin. Daarnaast is het gebruik van cellijnen niet gewenst aangezien reeds gedifferentieerde cellen andere eigenschappen bezitten, verder verwijderd van de gewenste kenmerken (Passmore et al., Immunology 2001).

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Kennis die uit deze samples gehaald wordt kan de voorgestelde celexperimenten niet vervangen maar wel verminderen.

Vermindering:

-De celtoegankelijkheid is geoptimaliseerd door ruime ervaring; er worden relatief veel cellen uit een relatief beperkt aantal dieren geïsoleerd. Tevens worden zowel de tibia als de femur gebruikt om het aantal geïsoleerde cellen zo hoog mogelijk te maken.

-Indien mogelijk worden beenmergcellen geogst uit muizen die voor een ander experimenteel doel werden geëuthanaseerd.

-Het gebruik van historische samples, waaronder ook humaan materiaal, zijn onderdeel van het plan van aanpak. Op basis van de kennis die uit deze samples gehaald wordt, wordt een keuze gemaakt voor het *in vitro* te bestuderen celtype. Zodoende worden onnodige celexperimenten voorkomen en het aantal dieren nodig voor celisolaties verminderd.

Verfijning: Het welzijn van de dieren wordt zo min mogelijk beïnvloedt; de dieren ondergaan geen behandelingen. De dieren worden gedood alvorens cellen worden geïsoleerd. De cellen afkomstig van beenmerg isolatie worden uitvoerig gekarakteriseerd binnen en buiten onze onderzoeksgroep.

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

De dieren gaan niet in experiment maar worden op een zo humaan mogelijke wijze opgeofferd omwille van het gebruik van hun beenmerg voor celisolaties.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

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?

geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

nvt

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De muizen worden gedood omdat hun beenmerg volledig nodig is voor de isolatie van de immuuncellen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3-R1</td> <td>Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	3-R1	Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen
Volgnummer	Type dierproef					
3-R1	Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen					

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Arteriële hypertensie, aortaklepverkalking, myocardinfarct en virale infectie zijn belangrijke risicofactoren voor het ontwikkelen van hartfalen. Vaak hebben patiënten ook andere aandoeningen die onder het metabole syndroom vallen, zoals overgewicht en diabetes.

- Angiotensine II (AngII) is een peptide dat vrijkomt onder hypertensieve omstandigheden en zowel in de circulatie als perifeer werkt op de vaten (constrictie) en op de cellen (het promoot celgroei, ontsteking, bindweefselvorming). Om deze reden wordt in ons onderzoek vaak gekozen om chronische arteriële hypertensie na te bootsen en hartfalen te veroorzaken in muizen middels subcutane chronische angiotensine II infusie gedurende maximaal 12 weken. Bloeddruk zal enkel worden gemeten ter controle van het bloeddrukeffect van AngII en daarom volstaat een meting middels tail cuff.
- Phenylephrine is een sympathomimetisch medicijn dat de acties van epinephrine nabootst en arteriële hypertensie veroorzaakt, en wordt in experimentele modellen gegeven om acute hypertensie te veroorzaken en de onmiddellijke respons van het hart hierop te onderzoeken.
- Transverse aortic constriction (TAC) is de meest gebruikte en bestudeerde methode om aortaklepverkalking, leidend tot acuut hartfalen, na te bootsen in muizen. Het grootste voordeel van dit model is dat de drukgradient in de aortaboog gekwantificeerd kan worden, wat het mogelijk maakt om linker ventrikel hypertrofie te stratificeren. De acute hypertensie geïnduceerd door TAC veroorzaakt een 50% toename in linker ventrikel massa binnen twee weken, daarom is dit model een goede keuze voor het bestuderen van farmacologische and moleculaire interventies die hypertrofie kunnen remmen.
- Myocardinfarct (MI) in de muis is een veelgebruikt model om myocardremodellering in de mens, na

een infarct of bij vaatlijden, na te bootsen. Het afsterven van een deel van het hartweefsel veroorzaakt ontsteking en in tweede fase remodelering van het gezonde hartweefsel, inclusief cardiomyocyt hypertrofie en bindweefselvorming.

- Een acute virale infectie leidt tot verhoogde hartcelafbraak en ontsteking, en vormt daardoor een levensbedreigende situatie. Coxsackievirus B3 (CVB3)-infectie geïnduceerde myocarditis is het meest gebruikte en best bestudeerde model van acute myocarditis-geïnduceerd hartfalen in muizen. Het grootste voordeel van dit model is dat de ziekte progressie, cardiale ontsteking gevolgd door afbraak van hartspiercellen en fibrose vorming, nauw verwant is aan het klinische beeld.

AngII-behandeling, TAC, MI of CVB3 wordt gecombineerd met een hoogvetdieet in het geval het kandidaat niet-coderend RNA molecuul een rol blijkt te hebben in metabolisme.

De primaire uitkomstparameters zijn 1) hartfunctie gemeten met echocardiografie of MRI 2) hartgewicht en 3) cardiale/perifere celresponsen: cardiomyocyt hypertrofie en metabolisme, endotheeldysfunctie, ontstekingsrespons en/of cardiale bindweefselvorming. Secundaire uitkomstparameters zijn 4) insuline resistentie, 5) hyperglycemie en 6) hypercholesterolemie.

Het manipuleren van de aanwezigheid van individuele kandidaat niet-coderende RNA moleculen in de muis kan op twee manieren gebeuren:

- 1) injectie van een korte DNA sequentie al dan niet in een vector (oligo/antagomiR/mimic/adeno-geassocieerde virale vector)
- 2) transgene muis

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 dier zal een aantal behandelingen ondergaan:





Een dier is maximaal 12 (max tijd tussen neonatale injectie en start behandeling) + 24 (max duur behandeling) = 36 weken in experiment. Dieren zijn nooit ouder dan 1 jaar bij opoffering.

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

Na vaststelling van de spreiding en het verwachte verschil per gen, op basis van de eerdere (in vitro) experimenten, zal gebruik worden gemaakt van de powerberekening obv de formule van Sachs om de definitieve groepsgrootten te berekenen. Ook kan dan de verwachte uitval gespecificeerd worden.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke wildtype of genetisch gemodificeerde muizen. Indien de genetisch gemodificeerde muizen reeds gefenotypeerd zijn door andere onderzoekers, zal gebruik worden gemaakt van muizen die onder normale niet-pathologische omstandigheden geen ongerief ondervinden van de genetische modificatie. Indien de genetisch gemodificeerde muizen nog gemaakt moeten worden, zal dit uitbesteed worden en zal het ongerief geregistreerd worden alvorens de dieren tbv dit onderzoek binnengehaald worden. De muizen worden geleverd door een vergund fokbedrijf of andere vergunde (internationale) universiteiten.

Per experiment/kandidaat molecuul zal gebruik worden gemaakt van maximaal 160 muizen. Er zijn maximaal 4 experimentele groepen (A1-A4) nodig. Per experimentele groep schatten we in, op basis van onze ervaring, maximaal 40 muizen te gebruiken (20 niet gemanipuleerde muizen en 20 muizen met gemanipuleerde kandidaatmolecuul expressie).

In 5 jaar tijd zullen maximaal 20 kandidaat moleculen onderzocht worden volgens het besluitmodel uit het projectvoorstel.

- Als uit de in vitro experimenten blijkt dat een kandidaatgen primair een rol speelt in cardiomyocyt dysfunctie en/of endotheeldysfunctie, zal gekozen worden voor TAC als experimenteel model van chronisch hartfalen.
 - o Vervolgens worden maximaal 16 kandidaatgenen ook onderzocht in een acuut model van arteriele hypertensie middels PE injectie, waarbij de primaire uitkomstparameter enkel cardiomyocyt hypertrofie is. Daarnaast wordt voor maximaal 16 kandidaatgenen het TAC experiment maximaal 2 maal herhaald: 1) voor het bepalen van de primaire

uitkomstparameter "cardiale/perifere celresponsen", die best worden gemeten vroeg na TAC (bijvoorbeeld na 1 week); en 2) voor de isolatie van hartcellen, waarvoor het hele hart nodig is en waarmee de rol van het kandidaatgen in elk celtype apart bepaald kan worden.

- Als uit de in vitro experimenten blijkt dat een kandidaatgen primair een rol speelt in ontsteking en/of bindweefselvorming, zal gekozen worden voor AngII als experimenteel model van hartfalen. Hierbij zullen per kandidaatgen maximaal 2 experimenten plaatsvinden voor het bepalen van de primaire uitkomstparameters; cellulaire responsen worden best gemeten vroeg na AngII (bijvoorbeeld na 1 week) en hartfalen wordt best gemeten laat na AngII (max 12 weken).
 - o Vervolgens wordt de rol van maximaal 16 kandidaatgenen ook bestudeerd in maximaal twee andere modellen van hartfalen waarbij ontsteking een rol speelt, namelijk MI- en/of CVB3-geïnduceerd hartfalen. Daarnaast wordt voor maximaal 16 kandidaatgenen het AngII experiment maximaal 2 maal herhaald: 1) voor het bepalen van de primaire uitkomstparameter "cardiale/perifere celresponsen", die best worden gemeten vroeg na AngII (bijvoorbeeld na 1 week); en 2) voor de isolatie van hartcellen, waarvoor het hele hart nodig is en waarmee de rol van het kandidaatgen in elk celtype apart bepaald kan worden.
- Als genen ook een rol in metabolisme hebben, wordt gekozen voor een combinatie van AngII, TAC, MI of CVB3 met hoog vet dieet.

Voor elk experiment zijn per kandidaat molecuul maximaal 160 muizen nodig. De volgende tabel geeft een samenvatting van de aantallen per experimenttype:

Wanneer oligos worden gebruikt voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, of genetisch gemodificeerde muizen, wordt gebruik gemaakt van 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van adeno-geassocieerde virale vectoren (AAV) voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van neonatale muizen (intracardiale injecties) of 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van neonatale muizen voor de injectie van het AAV, wordt pas met AngII/hoog vet dieet/TAC operatie/MI operatie/PE begonnen zodra de muis volwassen is (8-12 weken oud). CVB3 wordt geïnjecteerd in muizen van minimaal 4 weken oud.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

-vervanging: Het hart is een complex orgaan dat uit meerdere celtypen bestaat en dat blootgesteld is aan elementen uit de circulatie (cellen, boodschappers waaronder RNA moleculen, voedingsstoffen, zuurstof etc). Als alternatief op dierproeven kunnen hartspiercellen worden blootgesteld aan media van bijvoorbeeld gekweekte ontstekingscellen om de interacties tussen deze celtypen na te bootsen (co-cultuur), of kunnen organoïden uit stamcellen worden gebruikt. Echter, deze benaderingen hebben een aantal cruciale tekortkomingen: 1) in geval van co-cultuur wordt de invloed van het lokale milieu van de cellen genegeerd; het extracellulaire klimaat en de overige buurcellen zoals endotheelcellen, fibroblasten, gladde spiercellen, dendritische cellen etc.; 2) in geval van co-cultuur en organoïden zijn dit gekweekte cellen die niet alle eigenschappen van primaire en natuurlijk gedifferentieerde cellen in hun natuurlijke omgeving hebben; 3) elke hartspiercel wordt gevoed door een bloedvat, de experimentele condities missen de gereguleerde aanwezigheid van circulerende substanties zoals glucose, insuline en vetzuren alsook circulerende RNA moleculen. De *in vivo* omgeving is dermate complex dat proefdieronderzoek een cruciaal onderdeel zal blijven van proefondervindelijk medisch onderzoek gericht op het vinden van medicijnen. Voor het komen tot nieuwe inzichten voor de behandeling van hartfalen is het daarom noodzakelijk om proefdieren te gebruiken.

-vermindering: de statistische methode om tot een geschikte groeps grootte te komen voor significante betekenisvolle resultaten, resultaten uit historische samples en uit *in vitro* onderzoek, het combineren van controlegroepen indien mogelijk, en de ervaring van de onderzoeksgroep met dit model, waarborgen het gebruik van zo min mogelijk dieren.

-verfijning: het huidige AngII model is een redelijk verfijnd model om hartfalen te bestuderen, gezien er geen invasieve operaties bij komen kijken (Heymans S, Circulation 2013). Het huidige TAC model is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om hartfalen te onderzoeken (Heymans et al, Circulation 2013). Onze labtechnici worden continu getraind om de TAC en MI operaties uit te voeren en te verfijnen en daardoor het ongerief voor de muizen zo veel mogelijk te beperken, en doen dit inmiddels zonder het sternum in te knippen. Het model van CVB3 infectie is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om virale myocarditis te onderzoeken en door gebruik te maken van CVB3-geïnjecteerde muizen kunnen we de virale en ontstekingsrespons in het hart en de daaropvolgende ontwikkeling van hartfalen bestuderen (Fairweather and Rose PMC 2008). Het PE model is een geaccepteerd model van acute arteriële hypertensie met directe effecten op cardiomyocyten (Bueno et al. Circulation Research. 2001;88:88-96). De hartfunctie wordt op een non-invasie manier gemeten door middel van echo of MRI.

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

Dieren krijgen op de dag van de minipompimplantatie/TAC/MI operatie voorafgaand aan de operatie pijnstilling toegediend, en dit wordt zolang als nodig na operatie gegeven, gewoonlijk 1-3 dagen. De dieren worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen, en in geval van ziekte of pijn wordt een passende behandeling gezocht volgens vooraf vastgestelde humane eindpunten.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

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.

In geval de dieren een operatie ondergaan (minipompimplantatie, TAC of MI) krijgen de dieren peri-, per- en post-operatieve analgesie volgens geaccepteerde richtlijnen zoals GV SOLAS.

Alle dieren worden intensief gemonitord en bij afwijkend gedrag wijzend op pijn of ontsteking zal gepaste pijnstilling/ontstekingsremming worden ingezet.

De intracardale injectie in neonatale muizen wordt toegediend nadat de muizen tijdelijk en kortdurend op ijs hebben gelegen ter verdoving.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

-De neonatale dieren en hun moeders ondergaan lichte welzijnsaantasting in de vorm van verstoring van het nest. Tevens kan, wanneer toegepast, de intracardiale injectie leiden tot ongerief. Het virale construct zelf veroorzaakt geen ongerief.

-Daarnaast kan afhankelijk van het kandidaat molecuul, meer of minder ongerief worden ervaren. In het geval van het gebruik van virale vectoren is het ongerief door kandidaat molecuul manipulatie vooraf niet in te schatten. In het geval van het gebruik van transgene dieren is het ongerief voorafgaand aan de proef geregistreerd.

-Angiotensine II / TAC /MI/CVB3/PE worden toegepast om hartfalen te veroorzaken. Dit kan gepaard gaan met ademhalingsklachten en apathie.

-De minipompimplantatie en het openknippen van de huid voor TAC en MI operatie veroorzaken een huidwond die kan gaan ontsteken. De dieren kunnen verminderde mobiliteit ervaren.

-een PE injectie veroorzaakt een acute steiging in bloeddruk en kan gepaard gaan met hoofdpijn en duizeligheid.

-Hoogvetdieet: het vet in de voeding kan de vacht vettig maken. Het zelfverzorgend gedrag van de dieren zal dus nauwlettend in het oog worden gehouden. De muizen die een hoog vet dieet gevoed krijgen ontwikkelen pre-diabetes symptomen, zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte en verminderde fysieke gezondheid.

-CVB3 veroorzaakt in bepaalde muizenstammen gastro-intestinale klachten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Angiotensine II induceert hartfalen in de muizen met bovenbenoemde symptomen.

Het afbinden van de aorta (TAC) en MI induceren beide een hoge cardiale druk in het linker ventrikel en uiteindelijk ontwikkelen de muizen hartfalen met bovenbenoemde symptomen.

PE veroorzaakt acute hypertensie met bovenbenoemde symptomen.

Het hoog vet dieet induceert een pre-diabetes staat in de muizen.

Virale myocarditis gaat gepaard met een sterke ontstekingsreactie in het hart die hartfalen veroorzaakt.

Daarnaast is CVB3 is een enterovirus met gastrointestinale effecten.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen om aantasting van hun welzijn tijdig te ontdekken, waarna een besluit zal worden genomen het dier al dan niet uit experiment te halen met het oog op de vastgestelde humane eindpunten.

Er wordt a-septisch gewerkt om ontsteking van de wond na minipompimplantatie resp. TAC/MI operatie te voorkomen.

Tevens wordt, wanneer nodig, in neonatale muizen de intracardiale injectie uitgevoerd onder hypothermische omstandigheden door een ervaren dierproef deskundige ter voorkoming van complicaties en ongerief.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- open wond na minipompimplantatie met naar buiten komen van het pompje en ontsteking die niet reageert op behandeling.
- hartfalen ten gevolge van AngII-behandeling resp. TAC/MI / CVB3 infectie al dan niet in combi met hoog vet dieet, gepaard met moeilijk ademen en apathie. De mate van ongerief wordt ingeschat op basis van grimace scale, algemene indruk, activiteit, houding, gedrag, verzorging, verloop lichaamsconditie en gewicht, ademhaling, kleur mucosa, hartfunctiemetingen.
- Koorts en dehydratie ten gevolge van CVB3 infectie.
- Neonatale pups: geen melkspot/ verstoten uit nest.
- Ernstige huidproblemen als gevolg van hoog vet dieet.
- overige ziektes of condities welke ernstige pijn, ongerief of lijden indiceren.

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

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.

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.

Organen worden geexplanteerd tbv moleculair en histologisch onderzoek.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	4-R1	Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene db ^{-/-} muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Kandidaat niet-coderende RNA moleculen die een rol blijken te hebben in het ontwikkelen van hartfalen in een pre-diabetes model (angII/TAC + hoog vet dieet), zullen nader onderzocht worden in een meer vergevorderd diabetes model. Hiervoor maken we gebruik van transgene db^{-/-} muizen. Deze muizen zijn een geaccepteerd en goed bestudeerd model voor obesitas en type 2 diabetes. De muizen presenteren zich met diabetische symptomen die een leeftijdsgebonden progressie volgen, wat ook wordt gezien in patiënten met het diabetes. Daarnaast wordt in deze muizen ook een vroege insuline resistentie gedetecteerd dat resulteert in hyperglycemia. Db^{-/-} muizen worden gebruikt voor het bestuderen van cardiale gevolgen van diabetes, zoals diabetische cardiomyopathie.

Om de rol van de kandidaat moleculen te bestuderen in het metabole syndroom (diabetes, obesitas en hypertensie), worden de db^{-/-} muizen blootgesteld aan drukoverbelasting door AngII infusie of TAC operatie. Dit zal een meer klinisch relevant beeld geven van de patiënten die zich presenteren met het metabole syndroom in de kliniek.

De primaire uitkomstparameters zijn 1) hartfunctie gemeten met echocardiografie of MRI 2) hartgewicht en 3) cardiale/perifere celresponsen: cardiomyocyt hypertrofie en metabolisme, endotheeldysfunctie, ontstekingsrespons en/of cardiale bindweefselvorming. Secundaire uitkomstparameters zijn 4) insuline resistentie, 5) hyperglycemie en 6) hypercholesterolemie. Bloeddruk zal enkel worden gemeten ter controle van het bloeddrukeffect van Angiotensine II en daarom volstaat een meting middels tail cuff.

Het manipuleren van de aanwezigheid van individuele kandidaat niet-coderende RNA moleculen in de muis zal gebeuren door de injectie van een korte DNA sequentie (oligo/antagomiR/mimic/adeno-geassocieerde

virale vector).

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 dier zal een aantal behandelingen ondergaan:



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

Na vaststelling van de spreiding en het verwachte verschil per gen, op basis van de eerdere (in vitro) experimenten, zal gebruik worden gemaakt van de powerberekening obv de formule van Sachs om de definitieve groeps grootten te berekenen. Ook kan dan de verwachte uitval gespecificeerd worden.

B. De dieren

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

Er zal gebruik worden gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen (mannelijk en vrouwelijke) met een Db-/- achtergrond en controle db^{+/+} muizen. De muizen worden geleverd door een vergund fokbedrijf of andere vergunde (internationale) universiteiten.

Per experiment/kandidaat molecuul schatten we in, op basis van onze ervaring, maximaal 160 muizen te gebruiken (40 per experimentele groep; 20 niet gemanipuleerde muizen en 20 muizen met gemanipuleerde kandidaatmolecuul expressie). Het aantal experimentele groepen per experiment is 4:

In 5 jaar tijd zullen maximaal 16 kandidaat moleculen onderzocht worden met deze methode. In totaal wordt er dus geschat zo'n **2560 muizen** nodig te hebben.

Wanneer oligos worden gebruikt voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruik wordt gemaakt van adeno-geassocieerde virale vectoren voor de manipulatie van het kandidaat molecuul, wordt gebruik gemaakt van neonatale muizen van WT drachtige moeders of 5-14 weken oude muizen. Wanneer gebruikt wordt van neonatale muizen voor de injectie van het virus, wordt pas met angiotensine II begonnen zodra de muis volwassen is (8-12 weken oud).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

-vervanging: Het hart is een complex orgaan dat uit meerdere celtypen bestaat en dat blootgesteld is aan elementen uit de circulatie (cellen, boodschappers waaronder RNA moleculen, voedingsstoffen, zuurstof etc). Als alternatief op dierproeven kunnen hartspiercellen worden blootgesteld aan media van bijvoorbeeld gekweekte ontstekingscellen om de interacties tussen deze celtypen na te bootsen (co-cultuur), of kunnen organoïden uit stamcellen worden gebruikt. Echter, deze benaderingen hebben een aantal cruciale tekortkomingen: 1) in geval van co-cultuur wordt de invloed van het lokale milieu van de cellen genegeerd; het extracellulaire klimaat en de overige buurcellen zoals endotheelcellen, fibroblasten, gladde spiercellen, dendritische cellen etc.; 2) in geval van co-cultuur en organoïden zijn dit gekweekte cellen die niet alle eigenschappen van primaire en natuurlijk gedifferentieerde cellen in hun natuurlijke omgeving hebben; 3) elke hartspiercel wordt gevoed door een bloedvat, *in vivo* experimentele condities missen de gereguleerde aanwezigheid van circulerende substanties zoals glucose, insuline en vetzuren alsook circulerende RNA moleculen. De *in vivo* omgeving is dermate complex dat proefdieronderzoek een cruciaal onderdeel zal blijven van proefondervindelijk medisch onderzoek gericht op het vinden van medicijnen. Voor het komen tot nieuwe inzichten voor de behandeling van hartfalen is het daarom noodzakelijk om proefdieren te gebruiken.

-vermindering: de statistische methode om tot een geschikte groepsgrootte te komen voor significante betekenisvolle resultaten, resultaten uit historische samples en uit *in vitro* onderzoek, het combineren van controlegroepen indien mogelijk, en de ervaring van de onderzoeksgroep met dit model, waarborgen het gebruik van zo min mogelijk dieren.

-verfijning: het huidige model is een redelijk verfijnd model om het metabole syndroom te bestuderen, gezien er geen invasieve operaties bij komen kijken (Bilsen et al, PLoS One 2014) en de muizen spontaan obesitas en diabetes ontwikkelen. Het huidige TAC model is het meest geaccepteerde en bestudeerde model om hartfalen te onderzoeken (Heymans et al, Circulation 2013). Onze labtechnici worden continu getraind om de TAC operatie uit te voeren en te verfijnen en daardoor het ongerief voor de muizen zo veel mogelijk te beperken, en doen dit inmiddels zonder het sternum in te knippen. De hartfunctie wordt op een non-invasie manier gemeten door middel van echo of MRI.

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

Dieren krijgen op de dag van de minipompimplantatie/TAC operatie voorafgaand aan de operatie pijnstilling toegediend, en dit wordt zolang als nodig na operatie gegeven, gewoonlijk 1-3 dagen. Alle dieren worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen en in geval van ziekte of pijn wordt een passende behandeling gezocht volgens vooraf vastgestelde humane eindpunten.

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.

Dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek. Er wordt uitgebreid literatuuronderzoek uitgevoerd om te voorkomen dat onnodig studies worden herhaald, en ook worden relevante congressen bezocht om zicht te houden op andere onderzoekers in het veld die aan gelijkaardige onderwerpen werken.

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.

De dieren krijgen peri-, per- en post-operatieve analgesie volgens geaccepteerde richtlijnen zoals GV SOLAS. De dieren worden intensief gemonitord en bij afwijkend gedrag wijzend op pijn of ontsteking zal gepaste pijnstilling/ontstekingsremming worden ingezet.

De intracardiale injectie in neonatale muizen wordt toegediend nadat de muizen tijdelijk en kortdurend op ijs hebben gelegen ter verdoving.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

-De neonatale dieren en hun moeders ondergaan lichte welzijnsaantasting in de vorm van verstoring van het nest. Tevens kan, wanneer toegepast, de intracardiale injectie leiden tot ongerief. Het virale construct zelf veroorzaakt geen ongerief.

-Daarnaast kan afhankelijk van het kandidaat molecuul, meer of minder ongerief worden ervaren door de genmanipulatie. Dit is vooraf niet in te schatten.

-AngII/TAC wordt toegepast om hartfalen te veroorzaken. Dit kan gepaard gaan met ademhalingsklachten en apathie.

-De minipompimplantatie en het openknippen van de huid voor TAC operatie veroorzaken een huidwond die kan gaan ontsteken of slecht helen tgv diabetes. De dieren kunnen verminderde mobiliteit ervaren.

-db^{-/-}: Deze dieren ontwikkelen diabetische symptomen, zoals overgewicht, hoog bloedsuiker gehalte, hoog insuline gehalte, polyurie, polydipsie, slechte wondheling en verminderde fysieke gezondheid.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Angiotensine II induceert hartfalen in de muizen met bovenbenoemde symptomen.

Het afbinden van de aorta (TAC) induceert een hoge cardiale druk in het linker ventrikel en uiteindelijk ontwikkelen de muizen hartfalen met bovenbenoemde symptomen.

Db^{-/-} knockout induceert obesitas en diabetes.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord en regelmatig gewogen om aantasting van hun welzijn tijdig te ontdekken, waarna een besluit zal worden genomen het dier al dan niet uit experiment te halen met het oog op de vastgestelde humane eindpunten. Diabete muizen krijgen aangepaste verzorging/ huisvesting passend bij het ziektemodel.

Er wordt a-septisch gewerkt om ontsteking van de wond na minipompimplantatie resp. TAC operatie te voorkomen.

Tevens wordt, wanneer nodig, in neonatale muizen de intracardiale injectie uitgevoerd onder hypothermische omstandigheden door een ervaren dierproef deskundige ter voorkoming van complicaties en ongerief.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De dieren zullen voortijdig ge-euthanaseerd worden bij:

- open wond na minipompimplantatie met naar buiten komen van het pompje en en ontsteking die niet reageert op behandeling.
- hartfalen ten gevolge van AngII-behandeling resp. TAC, gepaard met moeilijk ademen en apathie.
- overige ziektes of condities welke ernstige pijn, ongerief of lijden indiceren. Db^{-/-} muizen ervaren ernstige immobiliteit als gevolg van ernstig overgewicht en diabetes. Mate van ongerief wordt o.a. bepaald aan de hand van grimace scale, algemene indruk, activiteit, houding, gedrag, verzorging, verloop lichaamsconditie en gewicht, ademhaling, kleur mucosa, hartfunctiemetingen.

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

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.

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.

Organen worden geexplanteerd tbv moleculair en histologisch onderzoek.

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

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002017924

Bijlagen

1

Datum 12 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen" met aanvraagnummer AVD107002017924. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 maart en 11 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. De vragen van de CCD zijn beantwoord en de ongeriefclassificatie en totaal aantal dieren in de aanvraag zijn aangepast. De Niet-technische samenvatting is ook tekstueel aangepast.

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 "Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 april 2017 tot en met 1 april 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.

Er is sprake van ernstig ongerief.

Datum:
12 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017924

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 maart 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
12 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017924



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht
Adres: Postbus 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 april 2017 tot en met 1 april 2022, voor het project "Niet-coderende RNA moleculen en het meta bole syndroom: rol in ontsteking, insuline resistentie en hartfalen" met aanvraagnummer AVD107002017924, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Zie voorwaarden.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 maart 2017, ontvangen op 13 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 maart en 11 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017924

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Isolatie van neonatale rat cardiale myocyten en fibroblasten en adulte rat cardiale myocyten				1920 neonatale ratten en 1032 volwassen ratten.
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	2.952	100% Licht	
3.4.4.2 Isolatie van beenmergcellen uit muizen				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	288	100% Licht	
3.4.4.3 Angiotensine II of TAC of CVB3 of MI of PE en hoogvetdieet-behandeling als model van ontwikkeling van pre-diabetes in combinatie met hartfalen				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	16.000	100% Matig	
3.4.4.4 Angiotensine II-behandeling of TAC in de transgene db/-muis als model van metabool syndroom in combinatie met hartfalen				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	2.560	25% Ernstig 75% 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 april 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.

Aanvraagnummer:

AVD107002017924

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:

AVD107002017924

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:

AVD107002017924

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 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.

Inventaris Wob-verzoek W17-09									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017984								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Vraag en antwoord aanvulling				x		x	x	
8	Verzoek nieuwe niet-technische samenvatting				x		x	x	
9	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	

AVD 107002017984



15 MAART 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 of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr> <tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr> <tr><td>KvK-nummer</td><td>50169181</td></tr> <tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg 4-6</td></tr> <tr><td>Postbus</td><td>616</td></tr> <tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD Maastricht</td></tr> <tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td></tr> <tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	50169181	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6	Postbus	616	Postcode en plaats	6200 MD Maastricht	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																	
KvK-nummer	50169181																	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6																	
Postbus	616																	
Postcode en plaats	6200 MD Maastricht																	
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]		
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[Redacted]																	
Afdeling	[Redacted]																	
Telefoonnummer	[Redacted]																	
E-mailadres	[Redacted]																	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]		
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[Redacted]																	
Afdeling	[Redacted]																	
Telefoonnummer	[Redacted]																	
E-mailadres	[Redacted]																	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 15 - 3 - 2017
- Einddatum 15 - 3 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Targeting Oxygen Metabolism to Improve Glioblastoma outcome
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Verbeteren van de behandeling van hersenkanker door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-UM
- Postadres Postbus 616, 6200 MD Maastricht
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

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

Náám

Functie

Plaats

Maastricht

Datum

1 - 3 - 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).
- 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.

Motivation

Glioblastoma multiforme (GBM)

GBM is the most common and malignant adult brain tumor. Newly diagnosed GBM patients have a median survival of 15 months and standard treatment consists of surgery, radiotherapy (RT) and adjuvant temozolomide (TMZ) ¹. Glioblastomas are highly resistant to radiation and acquired resistance to chemotherapy is invariably associated with recurrence. Treatment failure leads to a high mortality rate in GBM patients and prolonging survival and treatment response is a high priority. **What currently is lacking are alternative treatments that can complement standard of care to improve survival.**

Tumor hypoxia in GBM

Normal tissues maintain a balance between growth, proliferation and oxygen supply. This balance is altered during solid tumor growth where focal regions of low oxygen (hypoxia) arise and tumor growth disrupts normal vascular perfusion ². Tumor hypoxia is driver of tumor angiogenesis, a hallmark of most locally advanced tumors and is associated with a diminished therapeutic response, malignant progression and poor survival ³. Histologically GBM is characterized by extensive angiogenesis, diffuse micro-infiltration and invasion and necrosis. Extensive hypoxia is frequent in GBM and a negative prognostic factor associated with high grade, a shorter time to recurrence and reduced survival ^{4,5}.

Tumor heterogeneity; driver of progression and treatment failure

It is well recognized that biological heterogeneity is key for solid cancer progression and cause of variability in treatment response ⁶. Tumor heterogeneity is caused by stochastic mutations in tumor subpopulations as well as through their interaction and response to changes in the tumor microenvironment. One important cause of intratumor heterogeneity is the existence of tumor cells with stem-like characteristics or cancer stem cells (CSC) that retain self-renewal and differentiating capacity. CSCs have significant therapeutic implications as they are tumor initiating ⁷ and correlate with tumor grade and relapse ⁸. Clonogenic survival after RT and chemotherapy is predictive for local control and caused by Cancer Stem cells (CSC) that must be eliminated to achieve durable responses and cure ⁹. Factors which contribute to their intrinsic resistance include efficient DNA repair, scavenging of ROS, slow proliferation or cell cycle redistribution, rapid repopulation after treatment and multi-drug resistant phenotypes among others. Evidence suggest that normal stem cells and their tumorigenic counterparts reside in hypoxic niches which maintain their self-renewal programs. In primary GBM so called glioma stem cells (GSC) have been identified which are highly tumorigenic and treatment resistant ¹⁰ and behave as stem cells *in vitro* ¹¹⁻¹³. *In vivo* they reside in hypoxic areas, depend on glycolysis ^{14,15} and are preferentially expanded under hypoxia ^{16,17}. Blocking hypoxia signalling in tumors blocks self-renewal and survival of GSC cells and attenuates tumor formation ^{14,18}.

Hypoxic adaptation increased malignancy and resistance to treatment

Mammalian cells adapt to hypoxia by activating the UPR and mTOR kinase pathway ^{19 20} and activation of the O₂-labile Hypoxia Inducible transcription Factor (HIF), which drive a complex gene program involved in the adaptation of tumor cells to hypoxic stress ²¹. HIF is composed of a constitutively expressed HIF1 β subunit and an O₂-regulated HIF1 α subunit, which is hydroxylated under aerobic conditions by O₂-dependent prolyl hydroxylase domain proteins (PHDs). Under hypoxic conditions, PHD activity attenuates, HIF1 α accumulates, and forms a heterodimer with HIF1 β and induces transcriptional activation of specific target genes. The HIF transcriptional program is complex and induces metabolic adaptations to altered O₂ and nutrient supply, and induces pivotal oncogenic processes. Hypoxia also increases expression of glucose transporters and glycolytic enzymes and facilitates ATP production from glycolysis and suppresses ROS ^{22,23}. HIF activation is frequently observed in cancers and is a prognostic factor for poor outcome ³.

Hypoxia predictive factor

Intratumoral hypoxia has been shown to decrease therapeutic efficacy of RT and chemotherapy ²⁴. Hypoxic tumor cells are genetically unstable and show increased MGMT expression and thereby resistance to alkylating TMZ chemotherapy ²⁵. Furthermore hypoxic tumors are poorly perfused with increased interstitial pressure and altered drug transport and metabolism which contribute to chemo-resistance. Furthermore, hypoxic cells are 2-3 fold more resistant to killing than oxic cells. Our work has demonstrated that hypoxia also activates pro-survival programs by activating autophagy and thereby influencing treatment resistance ¹⁹. On the contrary, treatment also causes tumour reoxygenation leading to increased levels of ROS activating

HIF1 α which activates vascular endothelial growth factor A (VEGFA) production, leading to the formation of abnormal vessels contributing to tumor hypoxia. Thus hypoxia and treatment seem to be in a catch22 for treatment failure.

Targeting hypoxia in tumors

Hypoxia is a high priority therapeutic target that has yet to be fully exploited in GBM. Pre-treatment oxygenation of tumors is prognostic and predictive for RT response in head and neck squamous carcinoma and hypoxic gene classifiers can be used to predict prognosis²⁶. Three main approaches targeting tumor hypoxia can be distinguished; improving tumor oxygenation, hypoxic radiosensitization and elimination of hypoxic cancer cells.

While hypoxic modification treatments have been around for many decades only few clinical successes have been achieved mainly in head and neck cancer²⁷. This has been attributed to poor tumor penetration, low potency at tolerable doses, unacceptable toxicity at high doses, normal tissue effects due to bystander effect or normoxic activation, non-standardized treatments between centres and lack of patient selection using biomarkers of hypoxia response. The road from preclinical to clinical implementation is difficult and very expensive and the identification and testing of new classes of hypoxia modifying drugs and their clinical benefit may take many years.

Based on the theoretical background of tumor hypoxia as a key-contributor to RT and chemotherapy resistance and increased malignant behaviour in GBM, we are intrigued by the notion that currently available FDA approved lipid lowering drugs may also affect tumor O₂-consumption. Drug repurposing would provide us with excellent candidates to advance the therapeutic potential of hypoxia modification in human tumors and specifically GBM.

Reducing oxygen consumption for hypoxic modification in GBM

An alternative strategy to target tumor hypoxia, which is the key-concept in this work plan, is to reduce O₂ consumption in tumors cells making them less hypoxic. Mitochondrial respiration is responsible for 70–90% of total oxygen consumption and reducing mitochondrial function can have a major effect to balance supply and demand. While in normal cells mitochondrial respiration accounts for more than 90% of ATP production in tumors this balance is shifted to 50% from oxidative phosphorylation and 50% from glycolysis. Genetic analysis of tumors has identified oncogenic changes (i.e Myc, Tp53, AKT) that have been shown to contribute to this different tumor metabolism. For example as previously described, recent work has shown that HIF1 actively increases glycolysis and decreases mitochondrial function for metabolic reduction of oxygen demand²³.

Prolyl hydroxylases, Fenofibrates and Statins

Changing oxygen demand by interfering with oxidative phosphorylation seems theoretically a promising method in modifying tumor hypoxia. There is strong theoretical evidence that reducing oxygen consumption by as little as 30% is several fold more effective in reducing the hypoxic fraction (HF) of tumors than increasing vascular flow²⁸. Indeed tumors with reduced mitochondria and O₂ consumption are less hypoxic and more radiosensitive²⁹. Recently this has also gained clinical support by the finding that anti-diabetic metformin reduces tumor hypoxia by blocking oxidative phosphorylation which is associated with decreased cancer incidence and improved response to RT³⁰. Whether the pharmacodynamics and kinetics of metformin in patients also enable efficient mitochondrial inhibition in GBM, is unknown. Notwithstanding, these results illustrate the potential for repurposing FDA approved medication for cancer treatment, specifically those which also reduce tumor hypoxia.

Prolyl hydroxylases are dioxygenases that regulate the stability of HIFs in an O₂-dependent manner. Muscle cells targeted for PHD1 loss show reduced O₂ consumption and reprogramming to aerobic glycolysis protecting them from ROS induced damage under ischemic conditions³¹. This effect is almost completely due to upregulation of PPAR-alpha and HIF2 and can be mimicked by PPAR-alpha agonists (e.g. Fenofibrates, see below). Moreover PHD2 deletion in tumor endothelial cells improved tumor perfusion and oxygenation and response to chemotherapy in tumor models³². The temporal activation of HIF1/2 would increase VEGF, normalize vasculature and enhance chemotherapy and RT response^{32,33}. Known PHD

inhibitors (PHI), such as DMOG and FF4497, are well tolerated *in vivo* without any adverse effects. Taken together the PHD/HIF/PPAR axis seems an interesting strategy to block oxygen consumption and when scheduled appropriately with RT and chemotherapy may yield to improved responses in GBM patients.

Fenofibrates (FF) are FDA approved first-line lipid lowering drugs that act as agonists of PPAR-alpha; ligand activated nuclear hormone receptors that play key roles in energy homeostasis by modulating glucose and lipid metabolism. PPARs are often overexpressed in tumors and tumor endothelium^{34,35} and PPAR ligands have reported anti-tumorigenic and anti-metastatic effects in preclinical models^{34,36}. PPAR agonists can act both on tumor cells but also inhibit tumor angiogenesis³⁴. Metronomic dosing of FF in several studies has also shown to improve chemotherapy response³⁷. The anti-neoplastic effects of FF cannot solely be attributed to PPAR activation as FF have also been shown to directly induce tumor cell apoptosis as well as acutely block mitochondrial respiration resulting in a direct but transient switch to glycolysis. These properties have been shown to contribute to attenuating xenograft growth of glioblastomas and significantly reduced invasiveness³⁸. Part of these effects are thought to be mitigated through direct inhibition of CD133 glioma stem cells³⁹. These data strengthen the use of FF as a complementary anticancer drug, a concept supported by recent clinical trials in which chronic administration of FF along with chemotherapeutic agents used at relatively low doses minimizes the toxicity and acute side effects of chemotherapy while maintaining efficacy for patients with recurrent brain malignancies. One hypothesis is that this would improve response in conjunction with chemotherapy and RT however this has not been studied. Furthermore, in spite of these promising results, the mechanism(s) of the broad and significant anticancer effects of FF relative to other metabolic compounds remain unknown. *In vitro* data suggest that FF are several fold more potent inhibitors of mitochondrial consumption than metformin⁴⁰. **In conclusion PPAR agonists such as fibrates are attractive enhancers of treatment response by reducing mitochondrial respiration.**

Statins are among the most potent and widely prescribed cholesterol lowering drugs and have been associated with reduced tumor incidence (e.g. esophageal, colorectal, prostate, breast and hepatocellular cancer) in humans⁴¹. One of the side effects of statins is myofibrosis, a painful atrophy of muscle cells due to induction of aerobic glycolysis because of a block in oxygen consumption⁴² and recently shown to directly inhibit complex III⁴³. High statin doses are transiently well tolerated and have been shown in a large prospective study to acutely reduce hypoxic hepatitis during intensive care⁴⁴. Furthermore, phase II clinical trials are ongoing to assess fluvostatin on prostate cancer (NCT01992042). Thus like FF, statins cause reduced O₂ consumption albeit through different mechanisms. **If statins can reduce oxidative phosphorylation in GBM at tolerable doses is not known but would be an attractive hypoxic modifier well tolerated by patients and result in rapid clinical translation.**

Driving hypothesis

Acute and temporal reduction of oxidative phosphorylation in GBM using FDA approved drugs will improve RT and chemotherapy scheduling and response.

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?

Overall objective

The main objective of this project is to investigate if repurposing of compounds with known and accepted toxicity profiles can lower O₂-consumption in a preclinical model of glioblastoma in a way that will improve the therapeutic effect of chemotherapy (Temozolomide) and radiotherapy in tumor-bearing mice.

Expected outcome + deliverables:

- To establish clinically relevant *in vivo* orthotopic glioblastoma (GBM) platform
- To obtain proof-of-concept for hypoxic modification by reducing O₂-consumption on GBM response using FDA-approved drugs.
- To obtain strong preclinical evidence to apply for grants to initiate clinical studies.

The proposal is divided into two main aims with several subaims:

1 Establishment of Intracranial GBM Model suitable for hypoxic modification treatments

1a Establishment of the intracranial GBM model

- ✓ These experiments will establish which models have representative characteristics of human GBM (G0-noGo)

1b Establish Dose response to Radiotherapy

- ✓ These experiments will reveal the dose of radiation needed to achieve 50 % growth delay (G0-noGo)

1c Measurement of tumor HF in these models

- ✓ These experiments establish the HF at defined tumor volumes in the selected models (G0-noGo)

1d. Demonstrate if hypoxia modifying drugs reduce tumor hypoxia in GBM

- ✓ These experiments will establish which drugs will reduce the HF in the selected GBM models (G0-noGo)

2. Window of opportunity trial to establish if O₂-modification improves outcome in GBM

2a. Setting the window of opportunity (phase 0) trial

- ✓ These experiments will determine whether [REDACTED]-PET can be used to monitor treatment efficacy of the two selected compounds in the three best GBM models. (Go-noGo)

2b. Hypoxic modification combined with radiation

- ✓ These experiments will determine the effect of hypoxic modifying drugs in GBM. If no enhanced radiosensitization is observed compared to control group despite a reduction in O₂-consumption (IHC and [REDACTED]-PET) the experiments stops here (Go-NoGo)

2c. Hypoxic modification combined with radiation + temozolomide

- ✓ Herein we will demonstrate a window-of-opportunity for hypoxic modification in the treatment of GBM when combined with RT in a clinically relevant platform. When succesful the results should lead to the initiation of a clinical study.

Feasibility of our study:

The aims described are a direct consequence of previous and ongoing work within our group.



.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Cancer is a devastating disease affecting 1 in 3 people in their lifetime. The incidence is rising because of our aging population and has enormous societal and economic impact on our society. Treatment of cancer is often failing due to toxicity to the normal surrounding tissue, spreading of the disease (metastases) and the presence of therapy-resistant cancer cells. Glioblastoma (WHO, Astrocytoma grade IV) is the most common adult brain tumor that is highly malignant and resistant to treatment. Two year survival is only 10%. Since the last decade no major improvements in survival have been achieved. Tumor hypoxia is a common and tumor-selective feature of GBM and associated with worse outcome. Existing drugs repurposed for cancer treatment could find rapid implementation into clinical studies if found effective. *Here we will demonstrate if approved non-toxic medicines with known toxicity profiles in humans can reduce tumor hypoxia in GBM and increase treatment response.* If so we will rapidly initiate clinical studies to investigate this further in cancer patients.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

To study our main objective, i.e. to increase the therapeutic ratio for cancer by modulation of the tumor microenvironment, we have formulated two sub-objectives :

1. To establish clinically relevant *in vivo* glioblastoma models using an orthotopic immortalized and patient derived primary glioblastoma cells combined with image-guided radiotherapy to interrogate the efficacy of novel therapeutics with high translational impact.
2. To obtain proof-of-concept for hypoxic modification by reducing O₂-consumption on GBM response using FDA approved lipid lowering drugs.

Some of the milestones have already been achieved which are;

- 1 selection of appropriate cell lines models based on literature search and experimental validation

- in lab.
- 2 Identification of FDA approved compounds that reduce O₂-consumption in 1 PDX model and 1 GBM (U1242) cell lines in our lab.

Specific Aims of the proposal:

Aim 1 Establishment of New Intracranial Models

Sub aim 1a Establishment of the intracranial models

We and others have previously demonstrated that the U87-MG intracranial GBM model has very little chronic hypoxia/necrosis and local infiltration: the main characteristics of human GBM. [REDACTED] et al., 2016). There is a need to establish new intracranial models that are highly invasive and have a high HF and are highly angiogenic when grown intracranially reflecting the main characteristics of human GBM. We and others have previously demonstrated that the U87-MG intracranial GBM model has very little chronic hypoxia/necrosis and local infiltration: the main characteristics of human GBM. [REDACTED] et al., 2016) We will therefore establish several intracranial models using both murine (e.g. GL261) human (e.g. U1242-MG) cell lines and primary patient (PDX) derived tumors. GL261 and U1242-MG are previously characterized glioblastoma models that are highly invasive and have a high HF when grown intracranially^{49,50}. Several primary Patient derived GBM have been established in our lab as xenografts and harbor human GBM characteristics (High HF) (Unpublished [REDACTED] et al.,). Orthotopic models will be established using stereotactic surgery procedures from our lab and tumor growth will be monitored using BLI (Bioluminescence Imaging) and contrast enhanced micro-CT^{45,51}. *These experiments will enable a selection of those models that enable orthotopic growth in vivo (Go-noGo)*

Sub aim 1b Dose response to irradiation

In PDX, GL261 and U1242 GBM models tumor growth will be monitored non-invasively using BLI or contrast enhanced micro-CT and after 2-3 tumor volume doublings, a planning CT will be made and tumors will be given a single conformal dose of 0, 2, 4, 8 or 12 Gy at a standard dose rate of 3 Gy/min. Using humane endpoints or BLI/CT, a sub-curative dose will be established that reduces time to endpoint (or time to reach 10X BLI volume) by 50 %⁴⁷. *These experiments will reveal the dose of radiation needed to achieve 50 % growth delay.*

Sub aim 1c. Measurement of tumor hypoxia

For these models separate control arms will be used to assess the relationship between tumor volume and HF. Tumors will be harvested at 2 different tumor volumes as determined by BLI (U1242, GL261) or contrast-enhanced micro-CT (PDX & U1242, GL261). Before sacrifice, mice will be injected with pimonidazole, Hoechst and BrdU to measure tumor hypoxia, vessel perfusion and proliferation, respectively. The relative HF, microvessel density (MVD, CD31) and perfusion (Hoechst) will be calculated by determining the positive fraction within the total viable tumor area. We will determine the expression of endogenous hypoxia markers HIF1, HIF2 (EPAS), CAIX and PPAR-alpha. Tumor pieces will be directly frozen in liquid N₂ and used for IHC/RNA/protein analysis. All procedures have been developed in house, are published and are up and running^{45,52}. *These experiments will determine the HF and enable selection of three best models GBM models.*

Sub aims 1a-1c will define/confirm the tumor growth, HF and 50% growth delay upon RT or TMZ from 2 published models (GL261 and U1242) and identify one or more PDX models that are most suited for follow-up experiments. We will select top-3 models to continue with (Go-no-Go)

Sub aim 1d. The effect of hypoxic modification on GBM

Next we will investigate the effect of hypoxic modification of five FDA approved drugs on intracranial glioblastomas such as prolyhydroxylase inhibitors, PPAR agonists (e.g. fenofibrate) or statins (e.g. atorvastatin). Tumors will be established and at empirically determined volumes with known HF (Aim1b) a single dose of pimonidazole (hypoxyprobe, 120 mg/kg) will be injected. Next FDA approved drugs known to affect O₂-consumption at tolerable levels will be administered 2 hours later and 24 hours later mice will receive a second injection with EF5 (10 mg/kg), Hoechst (50 mg/kg) and BrdU after which the mice will be euthanized and tissues snap-frozen. EF5 is another hypoxia marker, which can be visualized with IHC as described³⁰. A control arm will receive vehicle or Metformin and Hypoxia activated prodrug⁵² as a negative and positive control respectively for O₂-modification³⁰. The use of two subsequent markers will enable us to determine the efficacy of hypoxic modification within the given time-frames

(0,5-4 hours). *These experiments will determine which are the best drugs and dose that have the highest reduction in O₂-consumption and reduction in Hypoxic fraction (Go-noGo).*

Aim 2. A window of Opportunity trial for O₂-modification and RT in GBM

Sub Aim 2a. Setting the window of opportunity (phase 0) trial

We will select top 2 compounds (aim 1d), which reduces O₂ consumption the most in the selected GBM models that has the highest HF. Our team has ample experience with [REDACTED] a 2-nitroimidazole derivative and hypoxia tracer which has improved tumor to blood ratios compared to F-MISO^{52,53} and we have used [18F][REDACTED] in a *first in human* phase I cancer study⁴⁸ and currently in several phase 2 clinical trials^{52,54}. To closely mimic clinical practice we will therefore combine [18F][REDACTED] PET imaging with micro-CT and perform a pre-treatment PET/CT scan followed by single drug administration and a post treatment rescan with [REDACTED] 24 hours later when the radionuclide from the baseline scan is washed-out, following the window-of-opportunity concept⁵⁵. [REDACTED] PET images will be acquired and analyzed using a micro-PET/CT scanner (Focus 120, Siemens MicroConcorde systems)⁵⁶. A volume of interest (heart/hindleg) will be defined as background and used for subtraction and a tumor to blood (TBR) or tumor to muscle (TMR) ratio of 1,4 will be considered hypoxic⁵³. Mice that do not respond (post-treatment scan) will receive a second –higher- dose of the drug and will be imaged 24 hours using 18F[REDACTED] tracer as described above. Control groups receive vehicle only and will be imaged similarly. *These experiments will determine whether [REDACTED] PET hypoxia imaging can be used to monitor a reduction in O₂-consumption of the two selected drugs in the GBM models (Go-noGo)*

Sub Aim 2b. Hypoxic modification combined with radiation

Next mice randomized in groups with comparable tumor volumes as determined above receive a single pretreatment [REDACTED] the hypoxia modifier or vehicle and 24 hours later a post treatment scan followed by a single dose of irradiation (determined in aim 1b) using Smart Platform and followed until endpoint (as defined above). Depending on the outcome the treatment will be differently adapted (increase drug dose, adjustment treatment plan and scanning time). Groups will be designated as *responders* and *non-responders* (see Figure1). A control group will receive vehicle, undergo a dynamic PET scan and will be treated with a single dose of radiation and followed using non-invasive imaging to determine until surrogate-endpoint using non-invasive imaging as determined before [REDACTED]. This group will be designated *non-responders* and would be comparable in real patient trials in which the drug would not be given (because of absence of hypoxia) or the treatment adapted (because of lack of response to the hypoxic modifier). *These experiments will determine the radiosensitization effect of hypoxic modifying drugs in GBM. If no enhanced radiosensitization is observed compared to control group despite a reduction in O₂-consumption (IHC and [REDACTED] PET) the experiments stops (Go-NoGo)*

Sub Aim 2c. Hypoxic modification combined with radiation + temozolomide

The above-described aims will address if a reduction in O₂ consumption will increase *in vivo* radio-sensitivity in intracranial models for glioblastoma. Standard of care treatment for GBM consists of radiotherapy (RT) with temozolomide (TMZ). In this last aim we will therefore investigate if hypoxic modification will also enhance standard of care treatment. We will focus on 1 model and investigate the drug which most strongly reduces O₂-consumption in conjunction with single dose radiotherapy. We have ample experience with TMZ and RT in conjunction with novel drugs and will follow our standard protocol: single dose RT + concomitant TMZ (30 mg/ml 2 weeks, 3 days on - 4 days off). These conditions give a significant tumor response [REDACTED]. Tumor growth will be followed by BLI/CT until surrogate endpoint (Figure 1). *Herein we will demonstrate a window-of-opportunity for hypoxic modification in the treatment of GBM in a clinically highly relevant platform.*




Figure 1: Establishment of a novel representative GBM model (aim1) and Window-of-opportunity trial in GBM platform (aim 2) using hypoxia trace [REDACTED] PET as biomarker to monitor treatment response to O2-modification prior to standard of care protocol (RT+TMZ) using image guided radiotherapy platform to measure outcome (surrogate endpoint). (BLI = Bioluminescence Imaging, uCT =micro-CT, [REDACTED] = hypoxia marker, uIGRT=image-guided radiotherapy)

Eventually, we aim to translate our findings into clinical applications [REDACTED]

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.

1 Establishment of New Intracranial GBM Model to test hypoxic modification treatments

Sub aim aim 1a Establishment of a realistic intracranial GBM model

Sub aim aim 1b Establish Dose response to Radiotherapy and TMZ

Sub aim aim 1c Measurement of tumor HF in selected models

Sub aim aim 1d Demonstrate if hypoxia modifying drugs reduce tumor hypoxia in GBM

2. Window of opportunity trial to establish that O2-modification improves outcome in GBM

Sub aim 2a. Setting the window of opportunity (phase 0) trial

Sub aim 2b. Hypoxic modification combined with radiation only

Sub aim 2c. Hypoxic modification combined with radiation + temozolomide

Animal procedures

- Intracranial surgery and implantation of tumor cells or fragments (aim 1,2)
- Non-invasive imaging via bioluminescence imaging and/ or contrast enhanced micro-CT (aim 1,2)
- Conformal Irradiation using small animal irradiator (aim 1,2)
- IP/IV Injection with pimonidazole, EF5, BrdU, Hoechst, tissue analysis by IHC (aim1,2)
- [REDACTED]
- IV/IP administration O2-modifiers (aim 1,2)
- IP administration temozolomide (aim 2)

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.

This is a very specific proposal aimed at addressing one question based on the fact that hypoxia limits Radiotherapy and Chemotherapy response:

Does reduction in O2-consumption in GBM in vivo improve the response to combination treatment with Radiotherapy and Chemotherapy (TMZ)?

The proposal follows a logical order from establishing a representative model that has a defined HF to identifying drugs that can reduce that HF and following our hypothesis and previous work that that RT

and or TMZ chemotherapy can improve the outcome of treatment as a consequence of reduced tumor hypoxia. The interdependency is directly related to the no-Go decisions

The necessary milestones can be deducted from the Go/no-GO chart (Figure 2 below) and include:

1. Establishment of a reproducible intracranial GBM model harboring characteristics of human GBM such as micro-infiltration, angiogenesis, HF and necrosis.
2. Defining RT and TMZ dose-response (50% reduction in Growth delay) in these GBM models
3. Establishing a quantitative reduction in O₂-consumption on the HF of intracranial GBM using non-invasive imaging and IHC tissue analysis
4. Defining a therapeutic window for intervention at increased O₂-availability using PET-imaging
5. Obtaining an enhanced therapeutic response using drugs combined with standard of care treatment (RT+TMZ)

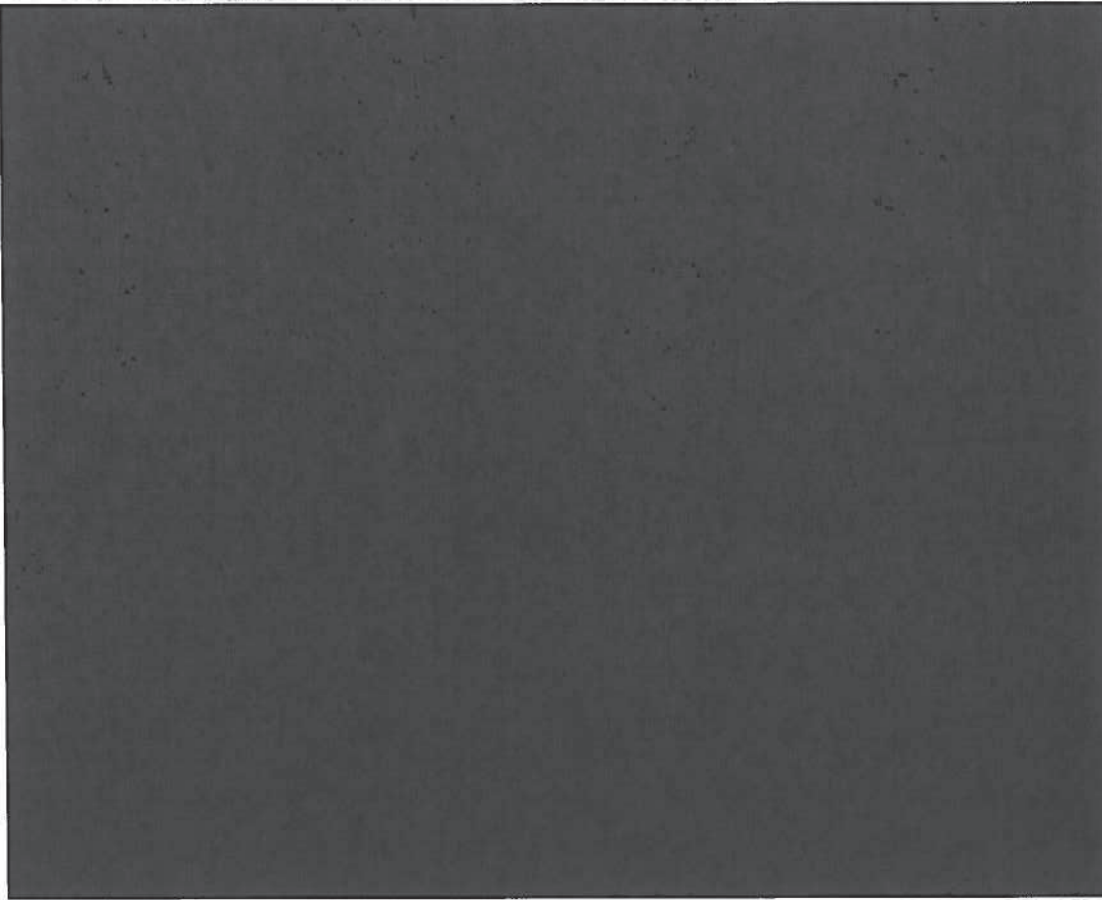


Figure 2: GO/no-GO flow chart with decision tree of appendices 1 (see text for details)

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	Therapeutic targeting of O ₂ -consumption in intracranial GBM models
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	

References:

- 1 Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 987-996, doi:10.1056/NEJMoa043330 (2005).
 - 2 Brown, J. M. & Giaccia, A. J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer research* **58**, 1408-1416 (1998).
 - 3 Vaupel, P. & Mayer, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer metastasis reviews* **26**, 225-239, doi:10.1007/s10555-007-9055-1 (2007).
 - 4 Spence, A. M. *et al.* Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin Cancer Res* **14**, 2623-2630, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4995 (2008).
 - 5 Evans, S. M. *et al.* Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* **10**, 8177-8184, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1081 (2004).
 - 6 Turner, N. C. & Reis-Filho, J. S. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol* **13**, e178-185 (2012).
 - 7 Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401, doi:nature03128 [pii] 10.1038/nature03128 (2004).
 - 8 Merlos-Suárez, A. *et al.* The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse. *Cell Stem Cell* **8**, 511-524 (2011).
 - 9 Baumann, M., Krause, M. & Hill, R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature reviews. Cancer* **8**, 545-554, doi:10.1038/nrc2419 (2008).
 - 10 Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-760, doi:nature05236 [pii] 10.1038/nature05236 (2006).
 - 11 Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* **63**, 5821-5828 (2003).
 - 12 Yuan, X. *et al.* Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**, 9392-9400, doi:10.1038/sj.onc.1208311 (2004).
 - 13 Beier, D. *et al.* CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. *Cancer research* **67**, 4010-4015, doi:10.1158/0008-5472.can-06-4180 (2007).
 - 14 Li, Z. *et al.* Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer cell* **15**, 501-513, doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018 (2009).
 - 15 Zhou, Y. *et al.* Metabolic alterations in highly tumorigenic glioblastoma cells: preference for hypoxia and high dependency on glycolysis. *J Biol Chem* **286**, 32843-32853, doi:10.1074/jbc.M111.260935 (2011).
 - 16 Seidel, S. *et al.* A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 *Brain* **133**, 983-995 (2010).
 - 17 Bar, E. E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W. & Eberhart, C. G. Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol* **177**, 1491-1502, doi:10.2353/ajpath.2010.091021 (2010).
 - 18 Soeda, A. *et al.* Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene* **28**, 3949-3959, doi:nc2009252 [pii] 10.1038/ncr.2009.252 (2009).
-
- 22 Jung-whan, K., Irina, T., Gregg, L. S. & Chi, V. D. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism* **3**, 177-185, doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002 (2005).
 - 23 Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* **3**, 187-197, doi:10.1016/j.cmet.2006.01.012 (2006).
 - 24 Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **11**, 393-410, doi:nrc3064 [pii] 10.1038/nrc3064 (2011).
 - 25 Sorensen, M. D. *et al.* Chemoresistance and chemotherapy targeting stem-like cells in malignant glioma. *Adv Exp Med Biol* **853**, 111-138, doi:10.1007/978-3-319-16537-0_7 (2015).
 - 26 Toustrup, K. *et al.* Gene expression classifier predicts for hypoxic modification of radiotherapy with nimorazole in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Radiother Oncol* **102**, 122-129, doi:10.1016/j.radonc.2011.09.010 (2012).
 - 27 Overgaard, J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol* **25**, 4066-4074, doi:10.1200/JCO.2007.12.7878 (2007).
 - 28 Secomb, T. W., Hsu, R., Ong, E. T., Gross, J. F. & Dewhirst, M. W. Analysis of the effects of oxygen supply and demand on hypoxic fraction in tumors. *Acta Oncol* **34**, 313-316 (1995).
 - 29 Bol, V. *et al.* Reprogramming of tumor metabolism by targeting mitochondria improves tumor response to irradiation. *Acta Oncol* **54**, 266-274, doi:10.3109/0284186X.2014.932006 (2015).
 - 30 Zannella, V. E. *et al.* Reprogramming metabolism with metformin improves tumor oxygenation and radiotherapy response. *Clin Cancer Res* **19**, 6741-6750, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1787 (2013).
 - 31 Aragones, J. *et al.* Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* **40**, 170-180, doi:10.1038/ng.2007.62 (2008).

- 32 Mazzone, M. *et al.* Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* **136**, 839-851, doi:10.1016/j.cell.2009.01.020 (2009).
- 33 Leite de Oliveira, R. *et al.* Gene-targeting of Phd2 improves tumor response to chemotherapy and prevents side-toxicity. *Cancer cell* **22**, 263-277, doi:10.1016/j.ccr.2012.06.028 (2012).
- 34 Panigrahy, D. *et al.* PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 985-990, doi:10.1073/pnas.0711281105 (2008).
- 35 Holland, C. M. *et al.* Transcriptome analysis of endometrial cancer identifies peroxisome proliferator-activated receptors as potential therapeutic targets. *Mol Cancer Ther* **3**, 993-1001 (2004).
- 36 Niho, N. *et al.* Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer research* **63**, 6090-6095 (2003).
- 37 Robison, N. J. *et al.* A phase II trial of a multi-agent oral antiangiogenic (metronomic) regimen in children with recurrent or progressive cancer. *Pediatr Blood Cancer* **61**, 636-642, doi:10.1002/pbc.24794 (2014).
- 38 Wilk, A. *et al.* Molecular mechanisms of fenofibrate-induced metabolic catastrophe and glioblastoma cell death. *Mol Cell Biol* **35**, 182-198, doi:10.1128/MCB.00562-14 (2015).
- 39 Binello, E., Mormone, E., Emdad, L., Kothari, H. & Germano, I. M. Characterization of fenofibrate-mediated anti-proliferative pro-apoptotic effects on high-grade gliomas and anti-invasive effects on glioma stem cells. *J Neurooncol* **117**, 225-234, doi:10.1007/s11060-014-1385-6 (2014).
- 40 Brunmair, B. *et al.* Fenofibrate impairs rat mitochondrial function by inhibition of respiratory complex I. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 109-114, doi:10.1124/jpet.104.068312 (2004).
- 41 Kubatka, P., Kruzliak, P., Rotrekl, V., Jelinkova, S. & Mladosevicova, B. Statins in oncological research: from experimental studies to clinical practice. *Crit Rev Oncol Hematol* **92**, 296-311, doi:10.1016/j.critrevonc.2014.08.002 (2014).
- 42 Vaughan, R. A., Garcia-Smith, R., Bisoffi, M., Conn, C. A. & Trujillo, K. A. Ubiquinol rescues simvastatin-suppression of mitochondrial content, function and metabolism: implications for statin-induced rhabdomyolysis. *Eur J Pharmacol* **711**, 1-9, doi:10.1016/j.ejphar.2013.04.009 (2013).
- 43 Schirris, T. J. *et al.* Statin-Induced Myopathy Is Associated with Mitochondrial Complex III Inhibition. *Cell Metab* **22**, 399-407, doi:10.1016/j.cmet.2015.08.002 (2015).
- 44 Drolz, A. *et al.* Statin therapy is associated with reduced incidence of hypoxic hepatitis in critically ill patients. *J Hepatol* **60**, 1187-1193, doi:10.1016/j.jhep.2014.01.019 (2014).
- 49 Clarke, R. H. *et al.* Sustained radiosensitization of hypoxic glioma cells after oxygen pretreatment in an animal model of glioblastoma and in vitro models of tumor hypoxia. *PLoS One* **9**, e111199, doi:10.1371/journal.pone.0111199 (2014).
- 50 Zhao, Y. *et al.* An extensive invasive intracranial human glioblastoma xenograft model: role of high level matrix metalloproteinase 9. *Am J Pathol* **176**, 3032-3049, doi:10.2353/ajpath.2010.090571 (2010).



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project Verbeteren van de behandeling van hersenkanker door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen.
- 1.2 Looptijd van het project 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) Glioblastoom, zuurstof gebrek, niet-invasieve beeldvorming, radiotherapie, bestaande geneesmiddelen

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
- 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 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Glioblastoma Multiforme (GBM) is de meest voorkomende hersentumor bij volwassenen met ongeveer 600 patiënten per jaar in Nederland. De gemiddelde overleving na diagnose is slechts 15 maanden. Nieuwe GBM patiënten worden behandeld met een combinatie van chirurgie, radiotherapie en chemotherapie. Helaas werkt bij veel patiënten de radiotherapie en chemotherapie niet of maar tijdelijk. Nieuwe therapieën die tumorgroei vertragen en therapie-resistentie voorkomen zijn noodzakelijk om de levensverwachting van GBM patiënten te vergroten.
- Voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën is het belangrijk beter inzicht te

krijgen in de ontstaanswijze van GBM en de mechanismen van therapie-resistentie. Tumor hypoxie (zuurstofgebrek) dat ontstaat door defecte bloedvaten in de tumor is een belangrijk kenmerk van GBM en veroorzaakt de therapie-resistentie. In eerder onderzoek is aangetoond dat geregistreerde geneesmiddelen waaronder bloed-vet-verlagende medicijnen (o.m. Statinen) positieve effecten kunnen hebben op tumor hypoxie door verlaging van zuurstofverbruik in kanker cellen. Hiermee zou het effect van de huidige therapieën versterkt kunnen worden met als gevolg een beter resultaat van de behandeling en langere overlevingskansen voor de patiënt. Het onderzoek wordt gefinancierd door KWF Kankerbestrijding.

De doelstelling van deze aanvraag is driedelig:

- 1- Ontwikkelen van een muismodel voor GBM met alle karakteristieken van GBM bij patiënten, waaronder tumor hypoxie.
- 2- Identificeren van bestaande geneesmiddelen die deze tumor hypoxie verminderen.
- 3- Aantonen dat vermindering in tumor hypoxie leidt tot een betere therapie response

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

- 1- nieuwe toepassingen van reeds geregistreerde medicijnen die mogelijk de overleving van GBM verbeteren
- 2- versnelde start van patiënten studies
- 3-tumor Hypoxie is een algemeen kenmerk van kanker waardoor de bevindingen mogelijke breder toepasbaar zijn.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

We maken in dit onderzoek gebruik van volwassen muizen en verwachten dat er maximaal 1490 muizen nodig zijn in 5 jaar.

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

- 1-chirurgische ingrepen in het brein
- 2- tumor groei
- 3-bij-effecten van radiotherapie en chemotherapie zoals diarree gewichtsverlies, huidirritatie.

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

- 45 % maximaal matig ongerief
55 % maximaal ernstig ongerief

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Levensbeëindiging

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig

De communicatie tussen normale cellen (bloedvaten, bindweefsel etc.) en kankercellen in een tumor is bepalend voor de groei en het effect van anti-kankertherapieën. Deze complexe cel-interacties met (defecte) bloedvaten

is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

zijn op dit moment nog niet na te bootsen in het laboratorium waardoor het noodzakelijk is hiervoor een proefdiermodel te gebruiken.

4.2 Vermindering

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

De wetenschappelijk onderbouwing van gesubsidieerd onderzoek staat garant voor goede studies met een minimum aan proefdieren en ongerief. Vermindering wordt ten dele bereikt door celweek technieken. Beeldvormingstechnieken worden gebruikt om direct het effect van medicijnen op de tumor groei te meten en indien nodig aan te passen in een en hetzelfde levende dier, waar voorheen meerdere dieren nodig waren.

4.3 Verfijning

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

Bij dit onderzoek maken we gebruik van muizen omdat de kennis over kankerontwikkeling en therapie hier het best bekend zijn. Moleculaire beeldvorming om kanker groei en therapie respons zichtbaar te maken geeft een verfijning omdat je zonder instrumenten het lichaam in gaat om deze processen nauwkeurig te meten en indien nodig (net zoals bij patiënten) de therapie aan te passen.

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

We zullen dagelijks de dieren controleren op hun welzijn. Ze krijgen adequate verdoving en pijnstilling en indien een humaan eindpunt wordt bereikt wordt het dier uit het experiment genomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Appendix

Description animal procedures

1. This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
2. A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
3. For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht University
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | Intracranial GBM model for improving standard of care treatment using Hypoxic modification |
- 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.

One experimental disease model will be used :

Model: Intracranial (orthotopic) Glioblastoma in mouse (*mus musculus*).

Type: Human primary and human and murine established GBM cells will be used.

The used animal procedures within this study are aimed at:

- 1- Assessing glioblastoma growth in mice after intracranial surgery
 - High tumor take and phenotypic characteristics of human GBM; hypoxia and necrosis being the most important outcome parameters
- 2- Quantitative in vivo analysis of tumor hypoxia and hypoxic modification using non-invasive imaging
 - Bio-Luminescence Imaging (BLI) for growth monitoring
 - Contrast enhanced micro-CT for radiotherapy treatment planning
 - [REDACTED] or assessment tumor hypoxia and effect of hypoxic modification
- Quantitative in vitro tissue analysis of tumor hypoxia and hypoxic modification using IHC
 - Reduction in hypoxic fraction by drugs is the parameter
- 4- Assessing therapeutic efficacy from targeted conformal irradiation using an animal irradiator (Smart) + concurrent temozolomide treatment + hypoxic modification
 - Outcome is therapeutic response as tumor growth delay as measured by non-invasive imaging (micro-CT and BLI)

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

For all intracranial GBM models: wildtype immune-compromised (human models) or immune-competent (murine models) mice will be purchased and the following procedures will be conducted:

1. Administration of small molecules, drugs, and control vehicles
2. Surgery and orthotopic injection of cells/tissue-fragments in brain under adequate anesthesia and analgesia and euthanasia
3. Blood sampling following NCR3 procedure (<https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling>)
4. External beam irradiation using small animal irradiator (Smart)
5. Non-invasive imaging (BLI, micro-CT, micro-PET)

All animals (100%) will be undergo at minimum surgical intervention, non-invasive imaging and euthanasia (2).

The above-mentioned models will be used in evaluation of the defined research questions. Animals may be assigned to control, treatment, imaging, or other groups as listed below.

Overview of animal procedures, nature and frequency of each procedure are presented in appendix 1 Table 1.

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

Prior to performing an experiment we perform statistical analysis (power analysis) to ensure that we use the minimum number of mice per group. We use the statistical formula: $n = 2(z_{\alpha/2} - z_n)^2 * (s/d)^2$ in which s = variance, d = difference and $2(z_{\alpha/2} - z_n)^2 = F$, using a power of 80% with $\alpha = 0.05$ (two-sided tested), $F_{0.80} = 15.7$. The number of animals can therefore be calculated by $n = 15.7 * (s/d)^2$. We correct this number also for drop-out (e.g. 10% for no tumor formation or prematurely reaching human endpoints) and rounded up the final number only at the end. Values s and d will be based on literature and own published experience with intracranial models for GBM.

B. The animals

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

Mus musculus: Immune-competent or -compromised adult animals obtained from a commercial licensed breeder.

The total number of animals for each experimental arm, following the statistical methods described above, will be maximal 10 animals, taking into account a 10% drop-out.

A maximum of **1490** animals is requested within this appendix (justification attached in appendix 1_Table2.pdf and Go-No-Go chart).

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.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research

strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Although animal studies within cancer research are inevitable, due to the need of a complex homeostasis between a tumor, the tumor microenvironment and the surrounding normal healthy tissues, we will always consider the principles of replacement, reduction and refinement. Whenever possible, results will be obtained in 2D or 3D culture models such as spheroids and organoids. Extensive in vitro testing using, but not restricted to, cell lines, tissues, patient material, previously isolated animal materials (sections, proteins, RNA, ...) has been done to exclude treatment combinations predicted to be less effective/informative in vivo and thereby avoiding unnecessary animal experiments.

Reduction

By conducting non-invasive imaging modalities, the number of animals is largely reduced because each animal can be non-invasively imaged and their biological response quantitatively derived as a function of time. Additionally, repeated in vivo imaging as proposed in this application maybe used to establish a therapeutic window by using a single animal which at the optimal time point may be treated -only- when the drug is effective. Before embarking animal experiments, extensive literature studies and discussions with collaborators will enable us to select to optimal procedures and models. Imaging information obtained from different non-invasive imaging techniques (CT, PET, MRI and BLI) will be used to monitor treatment response. Especially for this purpose, in-house made clickable positioning beds have been developed to shorten overall animal anesthesia time. Anesthesia time is also reduced by using beyond state-of-the-art ultra-sensitive imaging equipment with short acquisition times, the use of optimal contrast agents (i.e. omnipaque) and highly efficient radionuclide labeling and detection (¹⁸F-HX4 micro-PET).

Refinement

Life with end-stage brain tumor is considered severe. The intracranial model is chosen because extensive literature point to important role so neurotrophic factors on glioma development and the blood-brain barrier which is an obstacle for efficient drug delivery and uptake. The intracranial model combined with multimodality imaging using human or murine GBM models is the model most closely related to human GBM and therefore expected to be the most relevant. We have extensive published [redacted] et al (2014, 2015, 2016) experience in using in vivo imaging to monitor tumor growth and will use BLI/CT imaging as surrogate endpoints prior to the occurrence of humane endpoints whenever possible. We previously established that tumor-BLI measurements at 10 times total photon increase compared to starting volume (=2 x doubling of the BLI signal) and/or a calculated CT tumor volume (125-150 mm³) tumors have undergone 2-3 volume doublings in situ. Although 100% of mice will be developing an orthopic brain tumor many mice will be euthanised using this surrogate endpoint for tissue analysis or to measure direct effect of oxgen modifiers (1-24 hr post drug) and will therefore not reach the classification of severe discomfort (endstage tumor).

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. These include use of appropriate analgesia and anesthesia procedures whenever necessary. There are no adverse environmental effects.

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.

n/a

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

of the Directive 2010/63/EU?

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used following to the GV-SOLAS guidelines (http://www.gvsolas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Anaest._Analgesie/Schmerztherapie_Mai_2015_e.pdf). These include use of appropriate analgesia and anesthesia procedures whenever necessary (Schäfer et al 2014, 2015, 2016). Follow-up of the animals will be done regularly, at least daily, to ensure rapid notifications of signs of discomfort. Obviously, after experimental procedures e.g. surgery, the animals will be followed up more frequently. Human endpoints, as described below, will be strictly followed.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Immune-compromised animals are susceptible to infection. End-stage intracranial tumors can cause increased interstitial pressure (brain), weight loss, loss of appetite, loss of coordination, abnormal gait, seizures, unresponsiveness and abnormal breathing. Radiotherapy can cause necrosis, inflammation, fibrosis in irradiated organs and skin toxicity (redness, inflammation and ulcerations) depending on the administered dose and lead to loss of fur pigmentation. Surgical procedures can cause infections, although with very low incidence, at the site of the wound. Chemotherapeutic drugs such as TMZ used in this study can cause unexpected adverse effects, depending on the administered dose (dose limiting toxicity), such as diarrhea and sickness although we have not observed this at these doses in combination with RT in our previous studies. Toxic side effects as a result of O2-modifying drugs are not expected because they already approved drugs taken for decades by millions of people without toxicity profiles in human and tested in mouse. Moreover they are only administrated during the short time course. All animals will be closely monitored for adverse effects and surrogate and humane endpoints will be applied when distress is unacceptable (see point J).

Explain why these effects may emerge.

Due to the fast tumor growth, normal tissue can lose its proper function. Radiotherapy can cause normal tissue toxicity due to production of reactive oxygen/nitrogen species (ROS) which may result in immediate cell death, inflammation, tissue fibrosis and unrepaired DNA damage which alters cellular

function. Surgery requires the skin to be cut and sutured. All these effects may result in increased discomfort. Dose-limiting toxicities of drugs and chemotherapeutics can unexpectedly occur in tumor-bearing animals while not observed in non-tumor bearing animals during testing phase, attributed to the bystander effect in cancer cells, i.e. drug when activated leaks out into neighbouring cells.

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

We will monitor the animals on a daily basis by experienced animal biotechnicians; if any unexpected adverse effect will show up we will take measures accordingly (e.g. adequate pain medication or antibiotics to prevent or combat infection). When using immune compromised mice preventive measures such as adequate housing and adjusted working procedures will be used. Surgery will be done aseptically and antibiotics will be applied whenever necessary. High energy diets and gel-pads for maintaining ions/fluids will be given when needed after surgery and administration of anti-cancer drugs and chemotherapeutic agents.

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.

If animals are unacceptably distressed (to be determined by the researcher and/or animal caretakers), humane endpoints will be applied.

The following situations will be considered as humane endpoints (<https://www.humane-endpoints.info/en/literature-references>):

1. Emaciation (> 15 % weight loss in 1-2 days or >20 % of weight loss (compared to weight at the start of the experiment) overall during the study)
2. Respiratory abnormalities
3. Dehydration accompanied by visible loss of muscle mass (cachexia)
4. Loss of coordination, abnormal gait, seizures
5. The tumor volume is more than 10 x starting volume using non-invasive imaging (BLI, CT). We previously established that tumor-BLI measurements at 10 times total photon increase compared to starting volume (=2 x doubling of the BLI signal) and/or a calculated CT tumor volume (125-150 mm³) tumors have undergone 2-3 volume doublings in situ.
6. Humane endpoints will be further based on altered general clinical symptoms: e.g. behavior, response to stimuli, lack of grooming / aggressiveness, skin, hair, feces... and other obvious symptoms indicative for more than moderate discomfort due to tumor burden or treatment.
7. If within 8 weeks after tumor implantation no reproducible tumor growth within a period of 4 consecutive weeks can be observed the animal will be euthanised and histological analysis will be performed to determine the presence of tumor cells.

Indicate the likely incidence.

The incidence of most parameters is less than 10%. The animals will be well monitored by experienced people and will aim to avoid to reaching these humane endpoints. Surrogate endpoints and frequent follow up of the animals will allow timely interventions to minimize these.

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').

Five procedure groups have been identified:

1. Administration of small molecule compounds, drugs, and control substances anesthesia and pain medication
 - a. Intraperitoneally (mild)
 - b. Intravenously (mild)
 - c. Inhalation anesthesia (mild)
 - d. Subcutaneous (mild)
2. Surgery and orthotopic injection of cells/tissue-fragments in brain under adequate anesthesia and analgesia (moderate) Euthanasia (mild max 1 times non-recovery)
3. Growth of intracranial brain tumor (moderate)

4. Tissue blood sampling. (max 3 times)(mild)
5. Irradiation (single dose schedule) (mild)
6. Non-invasive imaging under anesthesia (mild-moderate)

The method of administration will be determined based on the most appropriate method of administration. If multiple administration routes are possible, the administration route with lowest discomfort will be used. We note that 100% of the animals will be exposed to procedure 2 and one or more of the modalities listed above.

Table 2 summarizes the estimated numbers of animals with procedures and cumulative discomfort level. While individual procedures may be mild, the accumulated discomfort is presented as animals may have repeated mild discomfort procedures (becomes moderate) or a single moderate discomfort procedure.

Experimental procedures:

Animals may be assigned to control, treatment, imaging, or other groups as listed in Table 2.

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.

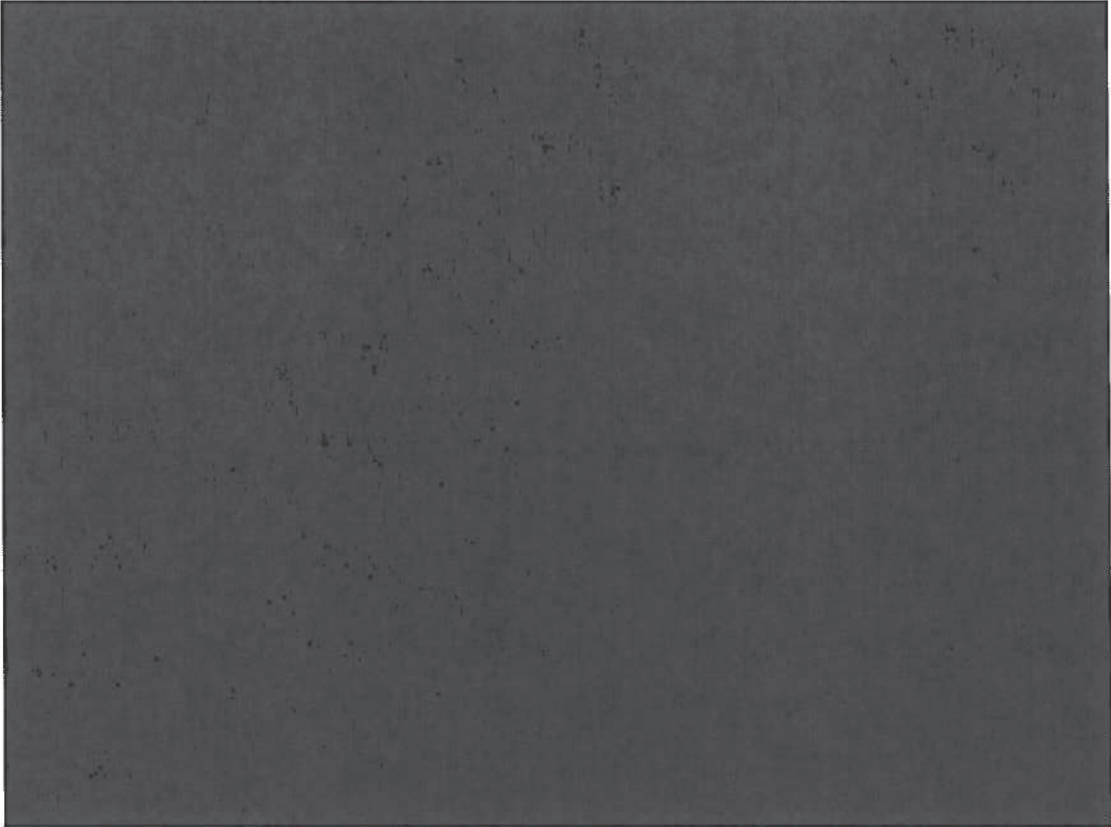
At the end of the experiments blood, tumors and other tissues will have to be collected for extensive analysis.

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

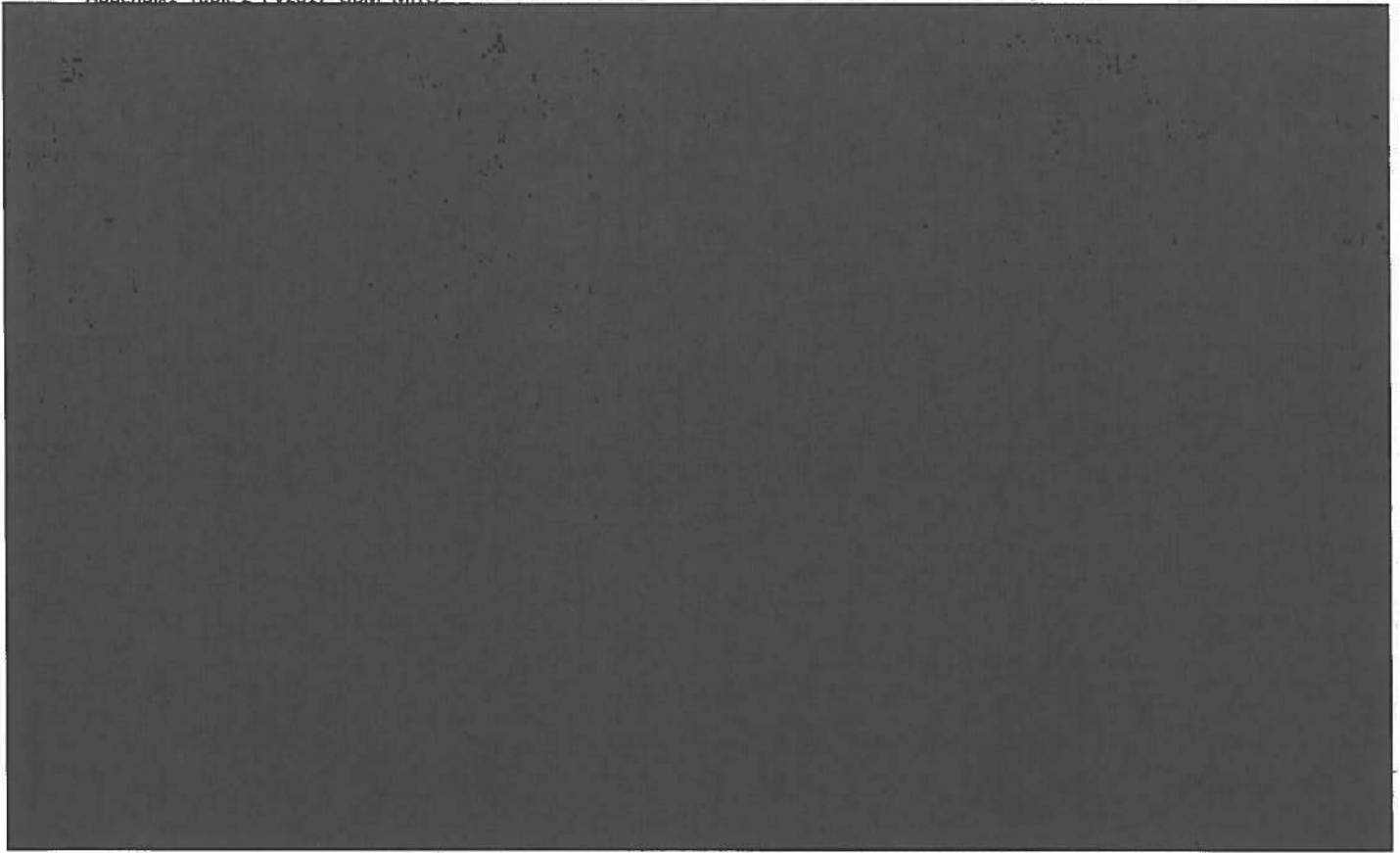
No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

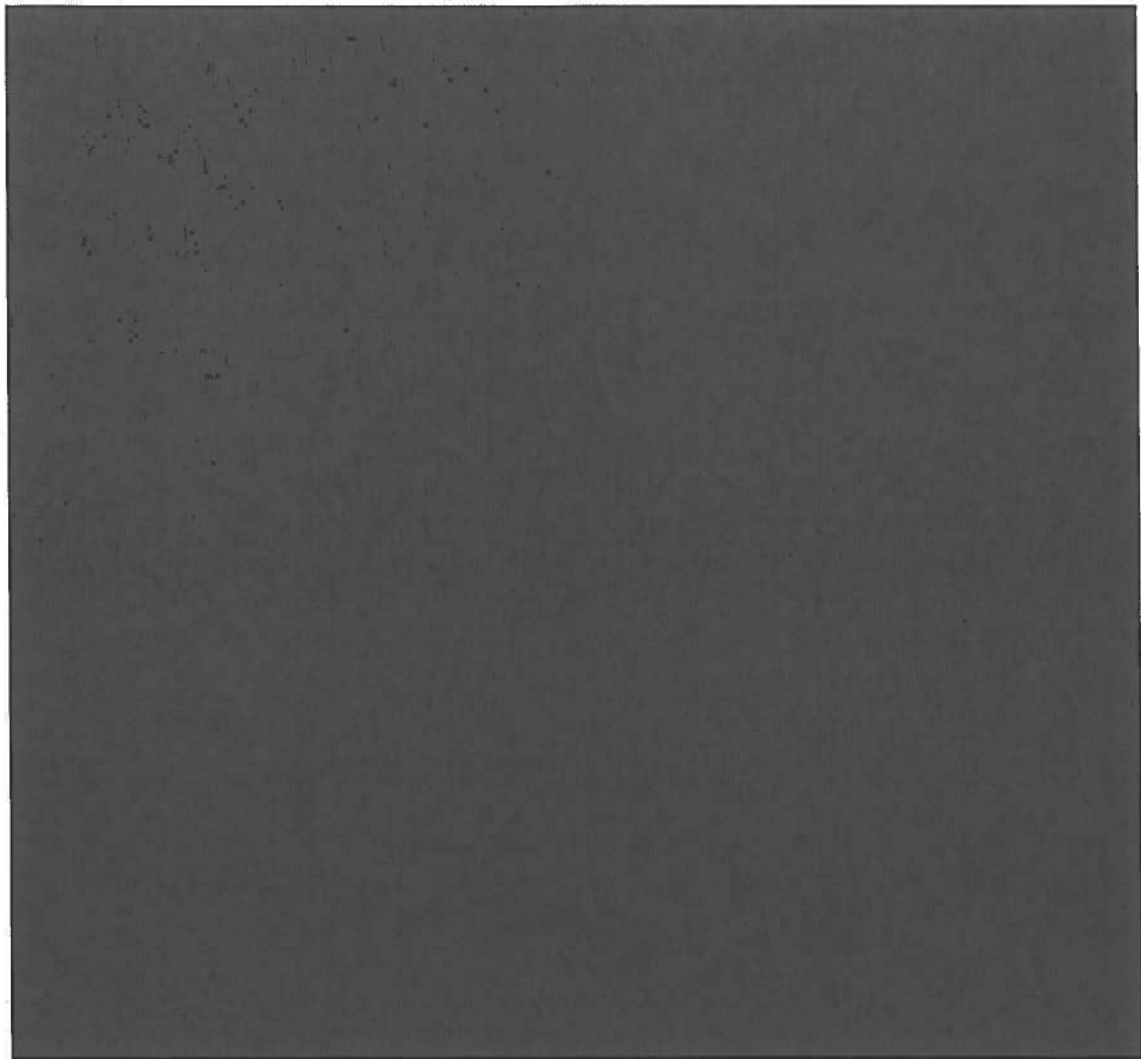
Yes

Appendix 1_table 1. PV_2017_GBM_MITO



Appendix 1 Table 2 PV2017 GBM MITO





DEC-advies PV 2017-003

Preambule;

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Targeting Oxygen Metabolism to improve Glioblastoma outcome.*
3. **Titel van de NTS:** *Verbeteren van de behandeling van hersenkanker door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen.*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC: *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon [REDACTED]
6. **Adviestraject** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC; 16-02-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken; 24-02-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum; 02-03-2017
 - Gestelde vragen, zie onderstaand:

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Algemene opmerkingen:

1. Er wordt gesteld dat “PPAR agonists such as fibrates are attractive enhancers of treatment response by reducing mitochondrial respiration”, maar bevorderen zij juist niet de mitochondriële oxidatie daar zij rechtstreeks de vetzuuroxidatie bevorderen?

Reactie:

De rol van PPAR in vetzuur oxidatie is bekend bij de aanvrager en wordt ook in de PV genoemd. Dit PV onderzoekt een andere rol van PPAR agonisten met enkele referenties die deze functie ondersteunen in vitro en in vivo waaronder GBM. (Wilk 2005, Brunmair 2004). Onze eigen resultaten in GBM cel lijnen (U1242 en een PDX model) bevestigen dat oa. fenofibraat mitochondriële zuurstof consumptie remt.

2. Werken alle drie beoogde groepen van farmaca naar verwachting in op de GBM?

Reactie:

Van alle farmaca is bekend dat ze de bloed hersenbarrière kunnen passeren. In vitro blijken de fenofibraten, prolyl hydroxylases en de statines de zuurstof consumptie van GBM cel lijnen te remmen in gepubliceerd werk en onze eigen ongepubliceerde onderzoek. Of deze farmaca ook werken in een GBM model is alleen van fenofibraat vastgesteld en is de basis van dit onderzoek.

3. Er wordt gesteld dat het terugdringen van tumor hypoxie, dan wel het stimuleren van tumor reoxygenation, (via HIF) kan leiden tot verdere hypoxie (“de beschreven “catch 22”). Wat niet geheel duidelijk is, is in hoeverre de huidige voorgestelde behandelmethoden een dergelijk ongewenst neveneffect kunnen geven of juist zouden omzeilen.

Reactie:

Dat zal moeten blijken uit de experimenten. De idee is dat door een tijdelijke opheffing van de hypoxie er meer zuurstof beschikbaar is in tumor cellen waardoor deze (tijdelijk) gevoeliger zouden moeten zijn voor radiotherapie. In deze experimenten vindt de toediening van farmaca alleen plaats kort voor en gedurende de radiotherapie.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1

Algemene opmerking:

1. In hoeverre leiden de toegediende farmaca tot systemische effecten en welke invloed zou zulks eventueel hebben op het ongerief der dieren?

Reactie:

In dit onderzoek worden bestaande geneesmiddelen met aanvaardbare toxiciteits profielen en bekende risico 's gebruikt, die door miljoenen mensen dagelijks worden genomen voor jaren achtereen.

Vraag:

1. Onder Sub Aim 2a wordt gesteld dat “we will select top 2 compounds”. Heeft U op basis van eerder *in vitro* onderzoek ook reeds een top twee kunnen identificeren en zo ja, waarom gebruikt U die dan niet als basis?

Reactie:

Het is niet te voorspellen of de top kandidaten in vitro ook de beste kandidaat drugs in vivo zijn. De farmacodynamica en farmacokinetiek zijn verschillend voor elke drug. Dat kan dus niet vooraf worden bepaald. Drugs die geen effect hebben in vitro worden in iedere geval niet meegenomen in vivo.

3.4.4

Appendix 1

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. Op welke uitleesparameter(s) is uw power analyse gebaseerd?

Reactie:

- orthotope tumorgroei in brein
- effect van bestraling en/of chemotherapie op de tumor groei in brein
- effect van zuurstof consumptie remmende drugs op hypoxische fractie in tumor/normale weefsel
- effect van bestraling en chemotherapie na zuurstof consumptie remmende drugs op tumor groei.

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

2. Kunt U nadere informatie geven over het reeds uitgevoerde *in vitro*-onderzoek zulks in relatie tot de beoogde farmaca?

Reactie:

In vitro is al vastgesteld dat sommige statines, een prolylhydroxylase remmer en de PPAR agonist fenofibraat een daling van de zuurstof consumptie in primaire GBM en U1242 en U87 GBM cel lijnen laten zien. Zoals in het PV vermeld, worden deze farmaca al gebruikt in mensen voor andere medische doeleinden. Het doel van de in vitro proeven is om die geneesmiddelen te identificeren die een nieuwe indicatie hebben namelijk een sterke daling van de zuurstof consumptie in tumor cellen.

3. Is elke compound reeds *in vitro* getest?

Reactie:

Nog niet elke compoud is in vitro getest en die compounds die gebruikt gaan worden in dierexperimenten zullen eerst in vitro getest worden.

J. Humane eindpunten.

4. De maximale duur waarin een dier in het experiment verkeert wordt niet genoemd. Zou een dergelijke tijdsspanne niet tot onderdeel kunnen worden gemaakt van de humane eindpunten?

Reactie:

Het eindpunt van tumor groei is een surrogaat eindpunt als gevolg van exponentiële tumor groei gemeten d.m.v. een combinatie van micro-CT en BLI zoals beschreven (J5). Als dieren 8 weken na implantatie geen reproduceerbare toename van tumor groei laten zien in een periode van 4 weken beschouwen we de chirurgie/tumor take als niet succesvol. Het dier zal worden geëuthanaseerd en d.m.v. behulp van histologie van het brein zal worden vastgesteld of er tumor cellen aanwezig zijn. "If within 8 weeks after tumor implantation no reproducible tumor growth within a period of 4 consecutive weeks can be observed the animal will be euthanized and histological analysis will be performed to determine the presence of tumor cells. Dit is toegevoegd in appendix (J7)

5. De DEC-UM vraagt zich af of de totale uitval 10% is? Hoe verhoudt zich dit tot alle genoemde parameters aannemende dat het uitblijven van groei van een individuele neoplasie hieronder mede begrepen is?

Reactie:

Dit percentage is bepaald aan de hand van eerdere orthotope GBM modellen in ons lab [redacted] et al., 2014,2015,2016). Uitval wordt met name verwacht in het uitblijven tumor groei. De U1242 is een bekend model in de literatuur en verwacht wordt dat dit model goed werkt.

Het is op voorhand niet te voorspellen hoe goed de primaire PDX modellen zullen aanslaan. Er wordt geen uitval verwacht als gevolg van bestraling, beeldvorming of behandeling met farmaca.

K. Classificatie van ongerief.

6. Het lijkt erop of de anesthesie frequentie kan oplopen tot maximaal 3 x per week met een maximum van 15. Is dat correct en kan deze frequentie eventueel nog verminderd worden daar een GBM toch niet zo extreem hard lijkt te groeien?

Reactie:

Dat is correct. Als de verdubbelingstijd van de GBM tumoren minder snel is dan het door ons gepubliceerde modellen waarop deze frequenties zijn gebaseerd dan kan de frequentie lager zijn.

7. De DEC-UM verzoekt U het leed a.g.v. tumorgroei op te nemen in de lijst?

Reactie:

Leed ten gevolge van tumor groei wordt gescoord als ernstig, echter aangezien dieren ge-euthanaseerd worden op vooraf bepaalde eindpunten, dus voordat ernstig ongerief ontstaat is dit in der werkelijkheid matig. Zie punt J en tabel 2. Dit is toegevoegd in appendix onder k: 3 Growth of intracranial brain tumor (moderate)

8. De DEC-UM verzoekt U aan te geven hoe bloed wordt afgenomen?

Reactie:

Bloed wordt afgenomen via saphena punctie beschreven volgens de NC3R richtlijnen

- Datum antwoord; 03-03-2017
- Verstrekte antwoorden; zie bovenstaand
- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. **Eventuele adviezen door experts: N.V.T.**

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**
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. **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 doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC-UM vertrouwt erop 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-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoeelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel van het project is te onderzoeken of bekende, door de FDA goedgekeurde, geneesmiddelen kunnen worden gebruikt om de zuurstofconsumptie in een preklinisch model van GBM (tumordragende muizen) zodanig te verlagen dat de therapeutische effecten van chemo- en radiotherapie worden verbeterd.

Het uiteindelijke doel is het verbeteren van de behandeling van hersenkanker (GBM) door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen.

Het betreft hier een fundamenteel en translationeel project.

Er is binnen dit project wel een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project.

De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.

Uit de aanvraag blijkt dat nieuwe therapieën die tumorgroei vertragen en therapie-resistentie voorkomen noodzakelijk zijn om de levensverwachting van GBM patiënten te vergroten en dat daar op dit terrein ook behoefte aan is. Het therapeutische arsenaal bij GBM is op dit moment beperkt effectief. De DEC-UM is derhalve van mening dat het directe doel, het onderzoeken of bekende, door de FDA goedgekeurde, geneesmiddelen kunnen worden gebruikt om de zuurstofconsumptie in een preklinisch model van GBM (tumordragende muizen) zodanig te verlagen dat de therapeutische effecten van chemo- en radiotherapie worden verbeterd, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

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 fundamenteel en toegepast wetenschappelijke project, dat gericht is op het verbeteren van de behandeling van hersenkanker (GBM) door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep, d.w.z. personen die hersentumoren ontwikkelen en hun naasten, de medische wetenschap en de farmaceutische industrie.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen matig en ernstig ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de medisch-wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over mogelijkheid om bekende, door de FDA goedgekeurde, geneesmiddelen in te zetten om de zuurstofconsumptie in een preklinisch model van GBM zodanig te verlagen dat de therapeutische effecten van chemo- en radiotherapie worden verbeterd.

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Verbeterde therapie en vergrote levensverwachting. Daardoor zal ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. GBH is de meest voorkomende, en ook een zeer kwaadaardige en moeilijk te behandelen, vorm van hersentumor bij volwassenen. De levensverwachting van patiënten met een dergelijke hersentumor is beperkt en in de laatste jaren ook niet verbeterd. Mochten de reeds bekende en erkende geneesmiddelen een positief effect laten zien, dan zijn klinische studies met deze middelen op afzienbare termijn mogelijk.

De farmaceutische industrie is ook belanghebbende in onderhavig projectvoorstel. Mogelijkerwijs worden er nieuwe toepassingsgebieden ontsloten voor geneesmiddelen die al een heel ontwikkelings- en goedkeuringstraject hebben doorlopen.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

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 beoordeling toe.

Meer informatie

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

Datum:

15 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017984

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur






Datum:
15 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017984

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10700
Naam instelling of organisatie: Universiteit Maastricht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 50169181
Straat en huisnummer: Minderbroedersberg 4-6
Postbus: 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
IBAN: NL04 INGB 0679 5101 68
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Maastricht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 
Functie: 
Afdeling: 
Telefoonnummer: 
E-mailadres: 

Datum:
15 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017984

Gegevens plaatsvervangende v

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:




Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 15 maart 2017
Geplande einddatum: 15 maart 2022
Titel project: Targeting Oxygen Metabolism to improve Glioblastoma outcome
Titel niet-technische samenvatting: Verbeteren van de behandeling van hersenkanker door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD Maastricht
E-mailadres DEC: 

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
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:

Datum:



Maastricht

1 maart 2017

Datum:

15 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017984



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002017984

Bijlagen

2

Datum 15 maart 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 15 maart 2017

Vervaldatum: 14 april 2017

Factuurnummer: 170984

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002017984	€ 935,00

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.

[Redacted]
Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 4 april 2017 17:30
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: RE: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Geachte [Redacted]

Wij hebben de aanvullende informatie in goede orde ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: [Redacted]
Verzonden: dinsdag 4 april 2017 10:33
Aan: 'Info-zbo'
CC: [Redacted]
Onderwerp: FW: AVD107002017984: Aanvullende informatie

LS,

Is antwoord in deze vorm voldoende?

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

From: [Redacted]
Sent: vrijdag 31 maart 2017 11:30
To: [Redacted]
Cc: [Redacted]
Subject: Fwd: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Beste [Redacted]

De dieren mogen zowel mannelijk als vrouwelijk zijn.

Laat je aub weten of je dit bericht hebt ontvangen door gestuurd naar de CCD

Met vriendelijke groet,

[Redacted]
Begin forwarded message:

From: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Subject: AVD107002017984: Aanvullende informatie
Date: 31 March 2017 at 21:40:02 GMT+13

Geacht [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Targeting Oxygen Metabolism to improve Glioblastoma outcome' met aanvraagnummer AVD107002017984. Wij hebben nog een vraag over uw aanvraag. In deze e-mail leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

-Uit uw aanvraag blijkt niet of u mannelijke en vrouwelijke dieren gaat gebruiken. U wordt verzocht dit alsnog aan te geven. Mocht u of alleen vrouwelijke of alleen mannelijke dieren gebruiken, wordt u verzocht toe te lichten waarom dat voor het behalen van uw doelstelling noodzakelijk is.

Opsturen binnen veertien dagen

U heeft veertien dagen de tijd om de ontbrekende informatie aan te leveren. De CCD zou uw aanvraag echter graag in de eerstvolgende CCD vergadering bespreken. Wij vragen u daarom de informatie uiterlijk donderdag 6 april 2017 aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 14 april 2017 3:36
Aan: Info-zbo
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Re: AVD107002017984: Aanvullende informatie
Bijlagen: PV 2017-003 NTS_V2.docx

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

De vergunninghouder is niet bereikbaar t/m 9 mei.
Per abuis heeft u eerdere versie van de NTS ontvangen van de UM.

Ik stuur u nu daarom direct de aangepaste NTS. "uit het experiment worden gehaald" is vervangen door "geeeuthanaseerd". De veranderingen zijn in het grijs weergegeven.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd,

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

 Maastricht University

From: Info-zbo
Date: Friday 14 April 2017 at 08:21
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: RE: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft uw aanvraag besproken en besloten deze te vergunnen.

De CCD is echter van mening dat u in de NTS het doden van dieren verhullend beschrijft waar het gaat om dieren die een humaan eindpunt bereiken. U geeft aan dat de dieren uit het experiment worden gehaald. U wordt verzocht hier aan te geven dat de dieren in dat geval gedood worden.

Pas wanneer wij de aangepaste NTS van u ontvangen kan uw aanvraag verder afgehandeld worden. De behandeling van uw aanvraag wordt daarom opgeschort totdat wij de aangepaste NTS hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,


Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: Info-zbo

Verzonden: dinsdag 4 april 2017 17:30

Aan: 

CC: 

Onderwerp: RE: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Geacht 

Wij hebben de aanvullende informatie in goede orde ontvangen.

Met vriendelijke groet,


Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: 

Verzonden: dinsdag 4 april 2017 10:33

Aan: 'Info-zbo'

CC: 

Onderwerp: FW: AVD107002017984: Aanvullende informatie

LS,

Is antwoord in deze vorm voldoende?

Met vriendelijke groet,



From: 

Sent: vrijdag 31 maart 2017 11:30

To: 

Cc: [redacted]

Subject: Fwd: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Beste [redacted]

De dieren mogen zowel mannelijk als vrouwelijk zijn.

Laat je aub weten of je dit bericht hebt ontvangen door gestuurd naar de CCD

Met vriendelijke groet,

[redacted]

Begin forwarded message:

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

Subject: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Date: 31 March 2017 at 21:40:02 GMT+13

To [redacted]

Cc [redacted]

Geachte [redacted]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Targeting Oxygen Metabolism to improve Glioblastoma outcome' met aanvraagnummer AVD107002017984. Wij hebben nog een vraag over uw aanvraag. In deze e-mail leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

-Uit uw aanvraag blijkt niet of u mannelijke en vrouwelijke dieren gaat gebruiken. U wordt verzocht dit alsnog aan te geven. Mocht u of alleen vrouwelijke of alleen mannelijke dieren gebruiken, wordt u verzocht toe te lichten waarom dat voor het behalen van uw doelstelling noodzakelijk is.

Opsturen binnen veertien dagen

U heeft veertien dagen de tijd om de ontbrekende informatie aan te leveren. De CCD zou uw aanvraag echter graag in de eerstvolgende CCD vergadering bespreken. Wij vragen u daarom de informatie uiterlijk donderdag 6 april 2017 aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616
6200 MD MAASTRICHT



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

Onza referentie
Aanvraagnummer
AVD107002017984
Bijlagen
1

Datum 20 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Targeting Oxygen Metabolism to Improve Glioblastoma outcome" met aanvraagnummer AVD107002017984. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 04 april 2017 en 14 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 31 maart 2017 hebben wij u gevraagd of u mannelijke en vrouwelijke dieren gebruikt in uw project en op 13 april 2017 hebben wij u gevraagd de NTS aan te passen. Wij kunnen ons vinden in uw aanvullingen.

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 "Targeting Oxygen Metabolism to Improve Glioblastoma outcome" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 april 2017 tot en met 15 maart 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.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 maart 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 spoedensend belang.

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

Meer informatie

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

Datum:
20 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017984

Centrale Commissie Dierproeven

Datum:
20 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017984

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 Maastricht

Adres: Postbus 616

Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT

Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 april 2017 tot en met 15 maart 2022, voor het project "Targeting Oxygen Metabolism to improve Glioblastoma outcome" met aanvraagnummer AVD107002017984, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. 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 13 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale Indiening op 14 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 maart 2017, ontvangen op 13 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 04 april 2017 en 14 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Intracranial GBM model for improving standard of care treatment using Hypoxic modification.				
	Muizen (Mus musculus) /	1.490	55% Ernstig 45% 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 maart 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.

Aanvraagnummer:
AVD107002017984

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:
AVD107002017984

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 gehulst. 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 gehulste 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:
AVD107002017984

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 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.

Inventaris Wob-verzoek W17-09									
nr.	document NTS 20171004	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	NTS oud			x					
3	NTS nieuw	x							
4	Projectvoorstel			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
9	Bijlage beschrijving dierproeven 3 aangepast			x					
10	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
11	Bijlage beschrijving dierproeven 4 aangepast			x					
12	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x	
13	DEC advies			x					
14	Verzoek en antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
15	Advies CCD		x						x
16	Beschikking en vergunning				x		x	x	



22 MAART 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 of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800	
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30275924
		Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	Faculteit Diergeneeskunde, Departement Pathobiologie
		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	[REDACTED]
		Afdeling	Faculteit Diergeneeskunde, Departement Pathobiologie
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 9 - 2017 |
| Einddatum | 31 - 8 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderwijs departement Pathobiologie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderwijs departement Pathobiologie
- 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 € 1684 Lege

Wijziging € Lege

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

Na ontvangst van de factuur

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

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam

[Redacted]

Functie

[Redacted]

Plaats

Utrecht

Datum

13 - 03 - 2017

Handtekening

[Redacted]



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Onderwijs departement Pathobiologie
- 1.2 Looptijd van het project | 1 september 2017-31 augustus 2022
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Onderwijs diergeneeskunde en biomedische wetenschappen

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

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- In het departement Pathobiologie van de faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht wordt veel onderwijs gegeven t.b.v. de opleiding Diergeneeskunde (zowel Bachelor als Master), de opleiding Biomedische Wetenschappen en binnen het Science department van het University College Utrecht. Een deel van dit onderwijs vindt plaats met dieren, die volgens de Wet op de dierproeven als proefdier aangemerkt moet worden, aangezien ze voorafgaand aan of tijdens het onderwijsmoment gedood worden. Het betreft onderwijs in de basisvakken Anatomie en Fysiologie en in de Pathologie. Iedere universitaire opleiding heeft zogenaamde eindtermen. Dit zijn de leerdoelen, die een student na het voltooien van zijn studie behaald moet

hebben.

Anatomie

In de eindtermen van de opleidingen diergeneeskunde en biomedische wetenschappen worden de basisvakken niet apart benoemd. Echter, anatomie is in meerdere opzichten heel belangrijk voor een groot deel van de eindtermen. De studenten moeten het basisbouwplan begrijpen van vogels en zoogdieren en de aanpassingen hierop, die noodzakelijk zijn voor bijvoorbeeld het verteren van planten of het kunnen bewegen op oneffen bodem. Verder is de kennis van anatomie van belang voor het begrijpen van de relatie tussen vorm (hoe ziet het eruit?) en de functie (hoe werkt het?). Het doen van een goed lichamelijk onderzoek kan alleen als de student een goede kennis heeft van de ligging van organen en dat geldt ook voor het kunnen bekijken van röntgenfoto's en het uitvoeren van operatieve ingrepen. De leerdoelen in het Anatomieonderwijs omvatten het verkrijgen van 3D-inzicht in de bouw van, voor de opleidingen diergeneeskunde en biomedische wetenschappen, relevante diersoorten. Juist door het gebruik van dierlijk materiaal binnen de anatomie wordt ook nog aan andere leerdoelen bijgedragen, zoals ethisch normbesef ten aanzien van gebruik van dierlijk materiaal in het onderwijs en het respectvol omgaan met dierlijk materiaal.

Fysiologie

De Nederlandse vertaling van het woord fysiologie is functieleer. Het vakgebied houdt zich bezig met alle processen in een cel, weefsels, organen en/of het hele lichaam en hoe die beïnvloed kunnen worden door normaal optredende activiteiten, zoals bijvoorbeeld vertering of beweging. Tijdens het practicum *farmacologische beïnvloeding spierfunctie* bestuderen de studenten de werking van 4 soorten spieren die bij aanvang van het practicum uit een kort daarvoor gedode rat geprepareerd worden. Tijdens het practicum werken studenten nauw samen om hun verwachting te formuleren, om betrouwbare resultaten te verkrijgen en deze te verklaren en mondeling te presenteren. Hierdoor komt er meer begrip van de samenhang van de functie en de vorm (anatomie), de toediening van medicijnen (farmacologie) en de scheikundige achtergrond van de processen (biochemie). Tevens is dit het eerste moment waarop de studenten de euthanasie van een dier van dichtbij meemaken. De studenten diergeneeskunde moeten hierop reflecteren en het verslag wordt opgenomen in hun portfolio *persoonlijke professionele ontwikkeling*.

Pathologie

Pathologie omvat de ziekteleer; in deze aanvraag specifiek de ziekteleer van vissen. De vis is niet standaard een onderdeel in de opleiding tot dierenarts; geïnteresseerde studenten kunnen dit vak kiezen. Het doel van het keuzevak "Vis" is om studenten een solide basis mee te geven voor de praktijk. Deze

basis houdt in dat studenten zelfstandig de gezondheidsstatus van een aquarium en een vijver, waarin vissen worden gehouden, kunnen beoordelen. Dit gebeurt aan de hand van het bepalen van de waterkwaliteit, de aard van de beplanting en de klinische aspecten van de vissen.

Om het klinisch beeld van de vissen te kunnen beoordelen moeten studenten enkele handelingen verrichten, waarbij niet alleen het kijken om de hoek komt kijken. Studenten moeten een huidafkrabsel kunnen maken en beoordelen, bloed afnemen en een kieuwmonster kunnen nemen. In het geval van ziekte in aquaria en/of vijvers met zieke vissen moeten zij in staat zijn om een zieke vis te anestheseren en te euthanaseren en vervolgens sectie op de vis te verrichten.

De reden waarom bij vissen meer standaardhandelingen worden verricht vergeleken bij andere huisdieren is, omdat een ziekte zich zeer snel kan verspreiden in een aquarium of vijver door de aard van het milieu en de vaak grote bevolkingsdichtheid met als gevolg flinke uitvallen. Het is dus zeer belangrijk dat een dierenarts snel kan inschatten met welke ziekte hij/zij te maken heeft en welke maatregelen onmiddellijk genomen moeten worden.

Dit houdt in dat een dierenarts ter plekke het meeste onderzoek zelf verricht en tevens weefselmonsters neemt en die behandelt om te versturen voor specialistisch diagnostisch onderzoek (virusdiagnostiek, histologisch onderzoek, bacteriekweek). Dit is dan ook het belangrijkste leerdoel van dit practicum.

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

De dierenarts is de enige professional die is opgeleid om de gezondheid van dieren te bewaken, dieren te genezen, en zoönosen (ziekten die ook een gevaar voor de mens opleveren) te herkennen. De taak van de dierenarts met betrekking tot de volksgezondheid en voedselveiligheid wordt steeds belangrijker geacht door overheid en burgers.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

De aanvraag is voor 10 pony's, 15 varkens, 15 runderen, 550 kippen, 100 ratten en 260 siervissen

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

Alle dieren worden voorafgaand of tijdens het onderwijsmoment gedood. Aangezien de dieren naar de faculteit diergeneeskunde getransporteerd moeten worden, zou hierbij hinder (stress) kunnen optreden. Verder kunnen een aantal vissen ongerief ondervinden door het ziekteproces waaraan ze lijden.

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

licht

3.6 Wat is de bestemming

Alle dieren worden gedood.

4 Drie V's

4.1 Vervanging

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

Anatomie:

Het eindleerdoel van de anatomie is verkrijgen van 3d inzicht van het dier (hoe ziet het dier er driedimensionaal uit onder de huid). Dit leerdoel kan in een groot aantal kleinere brokken worden gesplitst, zoals bijvoorbeeld het leren van de organen die aanwezig zijn, de naamgeving van structuren, het uiterlijk van die structuren etc. Dit zijn deel-leerdoelen die zonder proefdiergebruik behaald kunnen worden, maar via e-learning modules, tekstboeken, skeletmateriaal en preparaten in het uitgebreide studielandschap van de faculteit Diergeneeskunde. Het dissectieonderwijs (snijpracticum) wordt ingezet voor het bereiken van de laatste verdiepende stap, het vrijprepareren van structuren uit omliggende structuren. De plaatjes in het boek, op internet of in de e-learning programma's en zelfs de voor-geprepareerde preparaten zijn weliswaar gebaseerd op of verkregen vanuit de levensechte situatie, alleen 'in het echt' liggen alle structuren ingebed in vet of andere weefsels, waaruit ze losgemaakt moeten worden. Het beseft dat niet alles 'voor de deur' ligt, maar ingebed, waarbij tevens door het verwijderen en manipuleren met de organen gewerkt wordt aan een 3D-inzicht waar ook de handen betrokken bij zijn, is het uiteindelijke doel van het praktisch anatomie-onderwijs.

Voor een groot aantal snijpractica kunnen we aan reeds gedode dieren komen (surplus farmaceutische industrie, DierDonorCodicil), die we al dan niet in tweede instantie fixeren. Echter voor de in dit document bedoelde diersoorten (kip, pony, rund en varken) lukt dat (nog) niet (altijd). Af en toe komen er kippen beschikbaar, die na de dood overgenomen kunnen worden en ingevroren bewaard worden tot het onderwijsmoment.

Fysiologie

Er zijn nog geen digitale alternatieven voor het fysiologie-onderwijs voorhanden. De vrij eenvoudige simulaties die voorhanden zijn (*Mastering Physiology* van Pearson en *Clive* van Vetschools UK (http://www.vet.ed.ac.uk/clive_ed/CTD.htm)) worden wel als verplicht zelfstudiemateriaal gebruikt ter voorbereiding op het practicum. Meer geavanceerde digitale experimenteromgevingen zoals Labster, Lab buddy en Late nite lab hebben op dit vakgebied (nog) geen digitale experimenteromgeving.

Vis

Het onderwijs waarbij de inzet van proefdieren vereist is, wordt goed

voorbereid door de studenten. Er is geen alternatief voorhanden om de handelingen op te oefenen.

4.2 **Vermindering**

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

Anatomie kip: Vier studenten werken aan één kip. Uit ervaring weten we dat bij meer dan vier studenten per kip de efficiëntie van het onderwijs vermindert, want één student leest de handelingen voor, een tweede maakt aantekeningen en de twee overigen voeren de handeling uit. Deze taken rouleren gedurende het vier uur durende practicum. Indien er meer studenten bij de tafel staan, is de ervaring dat de student(en) die geen taak heeft (hebben) niet geconcentreerd mee doet (doen). Er zijn per jaar 175 BMW en 225 diergeneeskunde studenten.

Anatomie Master: Uit ervaring weten we dat het onderwijs aan paard en rund optimaal verloopt bij maximaal 20 studenten. Bij LH zijn vaak meer studenten aanwezig, maar deze verdelen zich over twee kadavers, nl. het varken en het rund. Het varken, meestal zo'n 60 kg, is niet groot genoeg voor 20 studenten, maar wel voor groepjes van vijf, die om de beurt prepareren. Per jaar zijn er maximaal 36 studenten in de Master paard en 75 studenten in de Master LH.

Fysiologie: Per practicum wordt 1 rat gebruikt, waarvan de spieren over 4 opstellingen verdeeld worden. Per opstelling werken 3 tot 4 studenten samen. Het vergroten van de practicumgroepen brengt met zich mee dat een aantal studenten als toeschouwer aanwezig zijn en niet zozeer als deelnemer. De effectiviteit van het onderwijs gaat dan verloren. In het eerste jaar diergeneeskunde zijn er 225 studenten, voor het UCU zijn er maximaal 30 studenten.

Vis: Twee vissen per student. De organen van de siervissen zijn te klein om alle diagnostische handelingen op één vis te kunnen uitvoeren cq. oefenen. De handelingen worden eerst door de docent gedemonstreerd en daarna door de studenten uitgevoerd.

4.3 **Verfijning**

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

Anatomie kip: de kip is de enige vogelsoort die integraal behandeld wordt in het onderwijs. Verder is de kip groot genoeg om alle belangrijke structuren te laten bestuderen.

Anatomie Master: het betreft hier dieren die behoren tot het onderwerp van de Master die de studenten gekozen hebben.

Fysiologie rat: de spieren van de rat zijn groot genoeg om in de opstelling gemonteerd te worden en om leesbare uitslagen te geven na stimulatie.

Keuzevak vis: er is nu gekozen voor siervissen. Indien beschikbaar zouden dit ook zieke kweekvissen kunnen zijn.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve

De dieren worden voorafgaand aan de dood verdoofd.

(schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

In het departement Pathobiologie van de faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht wordt

veel onderwijs gegeven t.b.v. de opleiding Diergeneeskunde (zowel Bachelor als Master) (Anatomie, Fysiologie en Pathologie), de Bachelor-opleiding Biomedische Wetenschappen (Anatomie) en binnen de Physiology track van het Science department van het University College Utrecht (Fysiologie) (verplicht onderdeel voor studenten die de SUMMA (Selective Utrecht Medical Master) willen gaan doen. Een deel van dit onderwijs geschiedt met dieren, die volgens de Wod als proefdier aangemerkt moet worden, aangezien ze voorafgaand aan of tijdens het onderwijsmoment gedood worden.

Anatomie

In de eindtermen van de opleidingen diergeneeskunde en biomedische wetenschappen staat geen apart katern voor basisvakken, noch voor het behalen van anatomische leerdoelen. Echter, Anatomie is een onmisbaar basisvak, omdat het het fundament vormt voor het begrijpen van het basisbouwplan, van vorm en functie relaties, voor het klinisch/lichamelijk onderzoek, voor de interpretatie van de resultaten uit beeldvormend onderzoek en voor de chirurgie. De leerdoelen in het Anatomieonderwijs behelzen het verkrijgen van 3D-inzicht in de bouw van, voor de opleidingen diergeneeskunde en biomedische wetenschappen, relevante diersoorten. Voor beide opleidingen worden ook nog andere leerdoelen behaald, zoals ethische normbesef ten aanzien van gebruik van dierlijk materiaal in het onderwijs en het respectvol omgaan met dierlijk materiaal.

Niet alle leerdoelen vereisen inzet van proefdieren. De 3D-eindterm kan worden onderverdeeld in een groot aantal kennis- en inzichtleerdoelen, zoals het herkennen en benoemen van anatomische structuren en het beredeneren van de functie en het innervatiepatroon. Deze leerdoelen kunnen worden behaald via e-learning modules, zelfstudie vanuit tekstboeken, skeletmateriaal en preparaten in het uitgebreide studielandschap van de faculteit Diergeneeskunde en via contactonderwijs met voor-geprepareerde preparaten voorafgaand aan het dissectieonderwijs. Het dissectieonderwijs wordt ingezet voor het bereiken van de laatste verdiepende stap, het vrijprepareren van structuren uit de omliggende structuren. De plaatjes in het boek, op internet of in de e-learning programma's en zelfs de voor-geprepareerde preparaten zijn weliswaar gebaseerd op of verkregen vanuit de levensechte situatie, alleen is hier wel een voorbereidingsstap aan vooraf gegaan. 'In het echt' liggen alle structuren ingebed in vet, bindweefsel of fascia, waaruit ze losgemaakt moeten worden. Het besef dat niet alles 'voor de deur' ligt, maar ingebed, waarbij tevens door het verwijderen en manipuleren met de organen gewerkt wordt aan een 3D-inzicht waar ook de handen betrokken bij zijn, is het uiteindelijke doel van het praktisch anatomie-onderwijs. Door te werken met de handen en instrumentarium, wordt de oog-hand coördinatie verbeterd (uit de literatuur is bekend studenten beter leren palperen als ze kunnen zien, wat er gepalpeerd wordt).

Voor een groot aantal dissectiepractica kunnen we aan reeds gedode dieren komen (surplus farmaceutische industrie, DierDonorCodicil), die we al dan niet in tweede instantie fixeren. Echter voor de in dit document bedoelde diersoorten (kip, pony, rund en varken) lukt dat (nog) niet (altijd). Af en toe komen er kippen beschikbaar, die na de dood overgenomen kunnen worden en ingevroren bewaard worden tot het onderwijsmoment.

Fysiologie

Het practicum *farmacologische beïnvloeding spierfunctie* is verplicht onderwijs voor iedere 1^e-jaars Dgk student en het resultaat telt mee voor de eindbeoordeling van het onderwijsblok Externe Beïnvloeding Celfunctie. Tijdens het practicum wordt met *ex-vivo* materiaal gewerkt afkomstig van surplus ratten. Studenten werken nauw samen bij 1) het opstellen van de hypothesen m.b.t. de farmacologische beïnvloeding van de drie spiersoorten (hart, glad en skelet), 2) het verkrijgen van betrouwbare resultaten en 3) het verklaren en mondeling presenteren van de uitkomsten. Studenten geven aan dat het ze ook helpt bij het verkrijgen van inzicht in de samenhang tussen verschillende vakgebieden (o.a. fysiologie, farmacologie, anatomie, biochemie). Tevens is dit het eerste moment waarop de studenten de euthanasie van een dier van dichtbij meemaken. Zij moeten hierop reflecteren en het verslag wordt opgenomen in hun portfolio *persoonlijke professionele ontwikkeling*. Voor de derdejaars studenten van het University College geldt dit bovenstaande ook en vormt dit practicum tevens een belangrijke voorbereiding op de SUMMA, de vierjarige Master waarmee deze studenten als arts en onderzoeker

kunnen afstuderen.

Uit het bovenstaande blijkt het practicum nauw is afgestemd op 5 van de 7 competentiegebieden van de toekomstige veterinaire professional (JAVMA 245(8), 906-913, 2014): wetenschappelijke vorming, samenwerken, persoonlijke ontwikkeling, veterinaire expertise en communicatie.

Volwaardige digitale alternatieven zijn vooralsnog niet voorhanden. De vrij eenvoudige simulaties die er zijn (*Mastering Physiology* van Pearson en *Clive* van Vetschools UK (http://www.vet.ed.ac.uk/clive_ed/CTD.htm)) worden wel als verplicht zelfstudiemateriaal gebruikt ter voorbereiding op het practicum. Meer geavanceerde digitale experimenteromgevingen zoals Labster, Lab buddy en Late nite lab hebben op dit vakgebied (nog) geen digitale experimenteromgeving. Dit jaar heeft de universiteit Utrecht onze USO (Universitair Stimuleringsfonds Onderwijs) aanvraag e-labs en pre-labs goedgekeurd en is 250.000€ beschikbaar gesteld om de voor- en nadelen van digitaal "in-silico" experimenteren te onderzoeken. In samenwerking met Labster zal de komende jaren in eerste instantie een digitale celbiologische experimenteromgeving worden ontwikkeld. Labster heeft interesse in het ontwikkelen van toepassingen voor de medische fysiologie, maar het heeft niet hun prioriteit. Wij gaan ervan uit dat de samenwerking met Labster over een aantal jaren zijn vruchten begint af te werpen en daarmee ook de deur opent naar de ontwikkeling van experimenteromgevingen op het gebied van spierfysiologie/farmacologie. In samenwerking met Labster, het UCU en de beta-faculteit zal de komende jaren dus eerst een digitale celbiologische experimenteromgeving worden ontwikkeld die de werkelijkheid enigszins moet benaderen; ruimte voor eigen vraagstellingen, variabele meetopstellingen, meetfouten en samenwerken. Deze pilot moet binnen 3 jaar duidelijk maken of met digitaal experimenteren bovenstaande leerdoelen/competenties kunnen worden gehaald. Indien de uitkomsten positief zijn zullen we een digitale experimenteromgeving *farmacologische beïnvloeding spierfunctie* gaan ontwikkelen, die het ex-vivo experiment gedurende een periode van 3 jaar stapsgewijs zal gaan vervangen.

Dit practicum is een verplicht practicum omdat:

- Het is voor studenten belangrijk om zo vroeg mogelijk in hun studie te kunnen ervaren of de studie Diergeneeskunde een juiste keuze is. Dat houdt o.a. in dat ze aan den lijve ervaren wat het is om een (surplus) dier te euthanaseren en met warm dierlijk materiaal te moeten kunnen werken. Dit moet dus zo vroeg mogelijk in de studie plaatsvinden.
- De complexe theorie van spierfunctie, elektrofysiologie en farmacologische beïnvloeding spierfunctie (hart, glad en skelet) wordt in het 1^{ste} jaar behandeld, maar veel studenten zijn niet in staat de samenhang zelf te ontdekken en tot een hoger abstractieniveau te komen. Ieder jaar blijkt uit de vele positieve opmerkingen in de studenten enquêtes dat het verplichte practicum ze enorm geholpen om de theorie te begrijpen, de samenhang te ontdekken en de toepassingsmogelijkheden te zien.
- Praktijkoefening is het op een na hoogste niveau in de leerpiramide van Bales.
- Het practicum is nauw afgestemd op het competentieprofiel van de toekomstige dierenarts; wetenschappelijk handelen en denken, samenwerken, persoonlijke ontwikkeling, veterinaire expertise en communicatie zijn allemaal aspecten die in het practicum aan bod komen.
- Een van de aanbevelingen in het rapport van de visitatiecommissie (American Veterinary Medical Association (AVMA)) is dat er meer aandacht in de Bachelor moet komen voor praktisch/experimenteel werk.
- De beschikbare digitale alternatieven (simulatieprogramma's) zijn nu nog te primitief, maar worden al wel ingezet als zelfstudiemateriaal ter voorbereiding op het echte practicum. Er wordt de komende jaren binnen de UU gewerkt (USO project e-labs en pre-labs) aan experimenteromgevingen waarin de handelingen van de student grote invloed hebben op de uitkomsten en waarbij dus ook onverwachte uitkomsten kunnen ontstaan die het probleemoplossend handelen en denken van de student stimuleren.

Er zijn geen duidelijke eindtermen voor derde jaars UCU studenten opgesteld. Zo'n 60% van deze studenten zijn van plan de SUMMA te gaan volgen en veel van de bovenstaande argumenten zijn ook van toepassing op studenten van het UCU. Het UCU heeft geen faciliteiten om practica te doen terwijl de studenten wel geacht worden voor masters te kiezen die een sterke experimentele component bevatten. Het practicum farmacologische beïnvloeding spierfunctie is een van de weinige wetenschappelijke practica die deze studenten in hun bachelor curriculum krijgen. De studenten zijn lovend over dit practicum, omdat ze mogen experimenteren in een laboratoriumomgeving en omdat het ze helpt bij het verkrijgen van overzicht en inzicht. UCU studenten moeten een weloverwogen keuze kunnen maken voor de SUMMA (opleiding tot arts en klinisch onderzoeker). Daarom is het essentieel dat ze middels dit practicum in aanraking komen met (surplus) proefdieren, bloed en levend weefsel.

Pathologie

Het doel van het keuzevak "Vis" is volgens het opleidingsprogramma en de eindtermen om studenten een solide basis mee te geven voor de praktijk. Deze basis houdt in dat studenten zelfstandig de gezondheidsstatus van een aquarium en een vijver, waarin vissen worden gehouden, kunnen beoordelen. Dit gebeurt aan de hand van het bepalen van de waterkwaliteit, de aard van de beplanting en de klinische aspecten van de vissen.

Om het klinisch beeld van de vissen te kunnen beoordelen moeten studenten enkele handelingen verrichten waarbij niet alleen het kijken om de hoek komt kijken. Studenten moeten een huidafkrabbel kunnen maken en beoordelen, bloed afnemen en een kieuwmonster kunnen nemen. In het geval van ziekte in aquaria en/of vijvers met zieke vissen moeten zij in staat zijn om een zieke vis te anestheseren en te euthanaseren en vervolgens sectie op de vis te verrichten.

De reden waarom bij vissen meer standaardhandelingen worden verricht vergeleken bij andere huisdieren is, omdat een ziekte zich zeer snel kan verspreiden in een aquarium of vijver zich door de aard van het milieu en de vaak grote bevolkingsdichtheid met als gevolg flinke uitval. Het is dus zeer belangrijk dat een dierenarts snel kan inschatten met welke ziekte hij/zij te maken heeft en welke maatregelen onmiddellijk genomen moeten worden. Daarnaast vertonen dode vissen heel snel autolyse waardoor de verdere diagnostiek bemoeilijkt wordt. Het opsturen van kadavers voor diagnostisch onderzoek is daardoor onder praktijkomstandigheden bijna ondoenlijk.

Dit houdt in dat een dierenarts ter plekke het meeste onderzoek zelf verricht en tevens weefselmonsters neemt en die zodanig behandelt om te versturen voor specialistisch diagnostisch onderzoek (virusdiagnostiek, histologisch onderzoek, bacteriekweek). Dit is dan ook het belangrijkste leerdoel van dit practicum.

Bij het keuzevak vis worden zieke vissen van vishandelaren gebruikt, die ongeschikt zijn voor de verkoop, om deze vaardigheden onder de knie te krijgen.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het onderwijs dient meerdere doelen, die omschreven staan in de eindtermen van eerder genoemde opleidingen. Het gaat hierbij om het begrijpen van het basisbouwplan van vogel en zoogdier, de voorbereiding van het uitvoeren van klinisch onderzoek, het diagnosticeren van ziekten, het verdiepen van het begrip van fysiologische processen en het voldoen aan een aantal overige competenties, die bereikt moeten zijn door de student bij afstuderen.

De faculteit Diergeneeskunde staat internationaal zeer hoog aangeschreven. Dit blijkt onder andere uit de accreditatie door de EAEVE (fase 2) (European Association of Establishments for Veterinary Education) en de AVMA (American Veterinary Medicine Association). Belangrijke elementen bij deze accreditatie zijn een goed functionerend kwaliteitsbeleid, regelmatige toetsing, gedegen chirurgical onderwijs, en de

aanwezigheid van technische hulpmiddelen. De toetsing is gerelateerd aan de eindtermen. Het behalen van de leerdoelen wordt getoetst en de onderwijskwaliteit geëvalueerd door middel van docenten en studentenevaluaties, kwaliteitszorggesprekken en jaarlijkse planning en control gesprekken van de diverse docenten die verantwoordelijk zijn voor het onderwijs met de onderwijsdirecteur. Daarnaast zijn er veel internationale contacten met studenten en docenten in de vorm van kennisuitwisseling en uitgevoerde projecten in het buitenland, omdat kennisvalorisatie één van de hoofddoelen van de faculteit Diergeneeskunde is.

3.3 Belang

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

Europese richtlijnen en verordeningen (bijv. 853/2004 en 854/2004), vertaald naar de nationale wetgeving vraagt een opleiding van goed toegeruste dierenartsen. Daarnaast is er het belang voor dier en samenleving, waar voor de dierenarts een belangrijke positie is weggelegd. Het gaat hierbij niet alleen om dierenartsen die precies op de hoogte zijn van wet- en regelgeving, maar die vooral met dieren kunnen werken, zowel curatief als preventief en in staat zijn tot ethische reflectie. Een belangrijke rol voor de dierenarts ligt er bijvoorbeeld in de zoönose detectie en de relatie humane geneeskunde-diergeneeskunde. De taak van de dierenarts met betrekking tot de volksgezondheid en voedselveiligheid wordt steeds belangrijker geacht door overheid en burgers. Een adequate opleiding tot dierenarts, die startcompetenties heeft om aan deze taken invulling te geven is noodzakelijk. Het belang van deze aanvraag voor dier en samenleving is hiermee aangegeven.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Anatomie Kip

In de Bachelor diergeneeskunde en biomedische wetenschappen worden de concepten van de orgaansystemen behandeld. Zo leren de studenten het basisbouwplan van zoogdier en vogel, aangevuld met de uitzonderingen hierop gebaseerd op een verschil in functie (bijv. een andere verschijningsvorm van de dikke darm bij planteneters). Er is hiervoor een aantal dissectiepractica ingepland die kunnen plaatsvinden op dieren die dood aangevoerd worden bij de afdeling (dodgeboren biggen, konijnen uit de farmaceutische industrie, ratten uit het onderzoek, honden en katten uit het DDC). Vogels worden niet regelmatig dood aangeboden, maar het is wel belangrijk dat de studenten inzicht krijgen in de anatomie van de vogel. Tijdens het voorbereidende onderwijs bestuderen de studenten de anatomie (nomenclatuur en structuren via het tekstboek en de preparaten in het studielandschap en via voorgeprepareerde preparaten tijdens contactonderwijs). Tijdens de dissectie krijgen ze echt gevoel voor de 3D opbouw van de lichaamsholte, omdat dat het enige moment is, dat de studenten de luchtzakken en de septa die de lichaamsholte opdelen, kunnen bestuderen. Tevens verkrijgen de studenten ook vaardigheid in het werken met verse weefsels. De kippen worden aangekocht en vervolgens direct na aankomst op de faculteit gedood. Per 4 studenten is 1 kip beschikbaar. Aangezien dit voor de studenten (zowel DGK als BMW) de eerste keer is dat ze met vers aangevoerde dieren werken, is hieraan in het onderwijs een reflectiemoment voor de studenten gekoppeld, dat aan het portfolio moet worden toegevoegd (als gespreksonderwerp met de tutor bij DGK) of wordt beoordeeld in de leerlijn ethiek en professioneel wetenschappelijk handelen (BMW).

Anatomie Master

De studenten zijn na het behalen van hun Master algemeen bevoegd in alle tot het vakgebied behorende te houden diersoorten en dat kan alleen maar bereikt worden door in de Bachelor te werken met concepten en de bijbehorende functionele uitzonderingen. In de Bachelor wordt bijvoorbeeld het concepten. Als voorbeeld wordt in de Bachelor het verteringstelsel als concept bestudeerd; we behandelen het ontstaan in het embryo en de aanpassingen die er mogelijk zijn/ nodig zijn op basis van het dieet. Een planteneter bijvoorbeeld heeft een fermentatievat met bacteriën nodig om het eten te kunnen voorverteren. Die fermentatievaten kunnen we in de diverse diersoorten terugvinden in de maag,

de blinde darm of de dikke darm. De studenten leren in de Bachelor dat een koe hiervoor een pens heeft, een konijn een blinde darm en een paard de dikke darm, maar de diersoortspecifieke anatomische details, die van belang zijn voor nadere diagnostiek of ziekteprocessen, worden onderwezen in het begin van de Master DGK. Hierdoor zijn de studenten in staat om verbanden te leggen tussen de locatie van een orgaan(systeem) en de benaderbaarheid ervan voor klinisch onderzoek, de (on)mogelijkheden van verspreiding van ziekteprocessen en de koppeling van de diverse orgaansystemen binnen het lichaam. In dissectiepractica bestuderen de studenten gedurende een week de topografische anatomie van een pony (Master paard) of een rund en een varken (Master Landbouwhuisdieren). Per practicumgroep van maximaal 25 studenten is één pony resp. één rund en één varken beschikbaar. De studenten bereiden zich hierop voor door de concepten door te nemen en het materiaal dat ter beschikking staat in het studielandschap zo goed mogelijk te bestuderen. Gezien de grootte van de diersoorten is er voor een aantal concepten, zoals borst- en buikholte, minder materiaal voorhanden voor zelfstudie cq. voorbereiding dan voor de kleinere diersoorten. Dat betekent dat meer, ook 'lagere', doelstellingen behaald moeten worden tijdens dit onderwijs. De studenten hebben vijf middagen (Master LH) of vijf hele dagen (Master paard) om dit te bereiken. Dit onderwijs is dus cruciaal voor het verwerven van een totaal 3D inzicht, aangezien er bijna geen andere mogelijkheden zijn om deze structuren driedimensionaal aan te bieden.

Fysiologie rat

Tijdens de Bachelor DGK wordt de meer algemene en orgaanspecifieke functieleer behandeld. Dit onderwijs wordt opgebouwd door te starten met hoorcolleges voor de grote lijn en de uitleg aan de hele groep studenten. In de werkcolleges wordt waar mogelijk gerekend met voorbeelden en beredeneerd wat een mogelijk gevolg van een interventie is. Een aantal van deze interventies zijn basaal aanwezig in beschikbare e-learning programma's. Echter, er is nog geen mogelijkheid om hele specifieke digitale interventies te doen. Volgens de diverse onderwijstheorieën leren studenten het meest door zelf proefondervindelijk resultaten te genereren en dat geldt zeker voor de farmacologische beïnvloeding van spiercellen. De gebruikte organen met spiercellen worden vers geoogst uit één kort daarvoor gedode rat en zo snel mogelijk in een opstelling gebracht. Voor dit onderwijs gebruiken we alleen surplusratten. Alternatieven zijn er nog niet. De beschikbare e-learning programma's gaan niet diep genoeg om de leerdoelen te bereiken. Het oogsten van de spieren uit kort daarvoor gedode surplusratten op een ander instituut levert teveel tijdverlies op met als gevolg functieverlies van de geoogste spieren. Dit onderwijs wordt aangeboden voor groepen van 15 studenten, die per groep van 3 of 4 studenten zich bezig houden met 1 specifieke spiergroep.

Keuzevak Vis

De vis zit niet standaard in het curriculum van diergeneeskunde, maar vormt voor een kleine groep dierenartsen wel een belangrijke werkkring, een voorbeeld hiervan zijn de gespecialiseerde duurdere 'gezelschap'-vissen, zoals Koi. Tevens is er in Nederland ook een opkomende visweekindustrie t.b.v. de visconsumptie (meerval en tilapia). Binnen het curriculum DGK is er verplicht een aantal keuzemomenten ingeroosterd waarin de studenten invulling kunnen geven aan hun gewenste uitstroomprofiel. De studenten die zich inschrijven voor het keuzevak Vis zijn dus gemotiveerd om zich te verdiepen in de materie rondom de vis en willen dit gebruiken als onderdeel van hun uitstroomprofiel. In dit keuzevak komt eigenlijk alles van de vis aan de orde; basisanatomie, fysiologie, pathologie, inclusief diagnostische ingrepen en de euthanasie.

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

Anatomie kip: euthanasie intrathecaal

Anatomie Master: euthanasie via overdosering slaapmiddel en daarna verbloeding via A. Carotis communis.

Fysiologie rat: anaesthesie via isofluraan, daarna decapitatie.

Keuzevak vis: inspectie wakkere vis, sedatie, monsternamen en doding

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 einddoel van de projectonderdelen zijn leerdoelen die behoren tot de eindtermen van de curricula van diergeneeskunde, biomedische wetenschappen en UCU. Het departement Pathobiologie draagt op verschillende momenten bij aan het verkrijgen van een deel van de eindtermen. Hoofdaanvrager van deze projectaanvraag is de portefeuillehouder onderwijs van het departement en als zodanig belast met de verantwoordelijkheid voor het onderwijs van de 3 divisies van het departement (Anatomie, Fysiologie, Pathologie) binnen de bachelor diergeneeskunde. Verder is zij verantwoordelijk voor het fysiologie-onderwijs en de tweede aanvrager (Wolschrijn) voor het anatomie-onderwijs dat buiten de eigen opleiding plaatsvindt. Anatomie en fysiologie zijn als basisvakken het fundament voor de meer klinisch geïntereerde vakken. Door de opbouw van het diergeneeskunde curriculum kunnen we beginnen met de basis in de vorm van concepten en de details toevoegen als de studenten daar echt aan toe zijn en die passen bij de Master van hun keuze. Zo hoeven studenten die kiezen voor bijvoorbeeld de Master paard niet alle details van rund en/of varken te bestuderen. Het keuzevak vis wordt alleen gekozen door studenten, die in deze diersoort geïnteresseerd is.

Anatomie kip wordt gegeven in het eerste studiejaar om inzicht te verkrijgen in de van het zoogdier zeer verschillende bouw van vogels. Het fysiologie-onderwijs wordt gegeven in het eerste jaar diergeneeskunde, geïntegreerd in een blok wat gaat over regelmechanismen en de mogelijke beïnvloeding daarvan. Bij het UCU sluit het fysiologie onderwijs aan bij het voorafgaande fysiologieonderwijs dat ook door het departement Pathobiologie verzorgd wordt.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Anatomie kip
2	Anatomie Master
3	Fysiologie rat
4	Keuzevak vis
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

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 vier uur durende dissectiepractica anatomie kip worden uitgevoerd op kort (4-24 uur) voor het practicum gedode dieren. De kippen worden koel bewaard, maar niet verder gefixeerd.

De studenten snijden in vers materiaal, waarvan de weefseigenschappen zoveel mogelijk met de echte situatie overeenkomen. Dit is de enige manier waarop de vliezen die de lichaamsholte in compartimenten onderverdelen, goed bestudeerd kunnen worden. Hierdoor verkrijgen de studenten inzicht in het driedimensionale bouwplan van de vogel. Goed inzicht in de opbouw van de lichaamsholten van de vogel is essentieel voor het goed kunnen uitvoeren van lichamelijk onderzoek en het toedienen van medicamenten.

De vogel is een integraal onderdeel van het curriculum Diergeneeskunde en is ook één van de doeldiersoorten binnen het biomedische onderwijs zowel als mogelijk proefdier als vanuit een evolutionair perspectief.

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 kippen worden gedood via een directe injectie in het foramen magnum met een overdosis barbituraat. We hebben ervaring met deze methode van euthanasie (jaarlijks 120 kippen), die weinig stress oplevert. Deze methode van euthanasie is overlegd met de IvD en de NVWA en akkoord bevonden.

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

Er beginnen per jaar 225 studenten diergeneeskunde en 175 studenten biomedische wetenschappen. De dissectiepractica kip worden gegeven in het eerste studiejaar van beide opleidingen. Vier studenten werken samen; één student leest de handelingen voor, een tweede maakt aantekeningen en de twee overigen

voeren de handeling uit. Deze taken rouleren gedurende het vier uur durende practicum. Indien er meer studenten bij de tafel staan, is de ervaring dat de student(en) die geen taak heeft (hebben) niet geconcentreerd mee doet (doen).

B. De dieren

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

Per jaar worden 110 kippen aangekocht bij een legkippenbedrijf. Het betreft hier kippen, aan het einde van de legperiode. Voor de studenten diergeneeskunde hebben we 60 kippen nodig: 57 voor de studenten, twee voor het voorsnijpreparaat en voorcollege en één voor instructie van de docenten en de student-assistenten. Voor het biomedisch onderwijs hebben we 47 kippen nodig; 44 voor de studenten, twee voor het voorsnijpreparaat en het voorcollege en één voor instructie van de docenten en studentassistenten. De overige drie kippen zijn in eerste instantie bedoeld als reserve. Bij kippen aan het eind van de legperiode komen relatief vaak purulente ontstekingen en afwijkingen van de lichaamsholte en eileider voor en zijn dan niet bruikbaar voor het vervolg van het practicum. Indien de reservekippen niet gebruikt worden tijdens het practicum, dan worden ze gebruikt voor het vervaardigen van preparaten/plastinaten t.b.v. de zelfstudie. Voor een periode van 5 jaar vragen we 550 kippen aan.

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.

Mochten er kippen surplus zijn, dan kunnen we die inzetten voor het practicum. Op dit moment is ons niet bekend of die dieren er zijn en wat de mogelijke voorgeschiedenis is.

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.

Tijdens het voorbereidende onderwijs bestuderen de studenten de anatomie (nomenclatuur en structuren via het tekstboek, de preparaten in het studielandschap en via voorgeprepareerde preparaten tijdens contactonderwijs). De preparaten die we hiervoor gebruiken zijn al jaren in ons bezit en worden keer op keer opnieuw gebruikt of zijn duurzaam gefixeerd (plastinatietechniek). Dit om ervoor te zorgen dat de voor dit onderwijs gedode dieren zo optimaal door de studenten worden gebruikt en alleen gewerkt hoeft te worden aan de hogere eindtermen die op een andere manier niet behaald kunnen worden.

Zoals uitgelegd onder 2A is meer studenten aan een tafel geen goede mogelijkheid, omdat voor de extra student(en) niet een duidelijke rol is en omdat daarvoor het kadaver te klein is. Tijdens de dissectie krijgen ze echt gevoel voor de 3D opbouw van de lichaamsholte, omdat dat het **enige** moment is, dat de studenten de luchtzakken en de septa die de lichaamsholte opdelen, kunnen waarnemen en de organen daardoorheen zien schemeren.

Er wordt gestreefd naar het gebruik van surplusdieren. Echter, ervaring is dat de kans hierop beperkt is.

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

De dieren worden op het bedrijf verzameld door de eigenaar. Direct na aankomst op de afdeling worden de dieren gedood door twee ervaren proefdiertechnici.

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?

Transport naar faculteit

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Vervoer in transportkratten

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

J. Humane eindpunten

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

X Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het onderwijs wordt uitgevoerd op dood materiaal

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.

Via een intrathecale injectie via het foramen magnum. Dit is een methode die is goedgekeurd door de NVWA en waar we veel ervaring mee hebben.

X Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

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 vier uur durende dissectiepractica anatomie kip worden uitgevoerd op kort (4-24 uur) voor het practicum gedode dieren. De kippen worden koel bewaard, maar niet verder gefixeerd.

De studenten snijden in vers materiaal, waarvan de weefseigenschappen zoveel mogelijk met de echte situatie overeenkomen. Dit is de enige manier waarop de vliezen die de lichaamsholte in compartimenten onderverdelen, goed bestudeerd kunnen worden. Hierdoor verkrijgen de studenten inzicht in het driedimensionale bouwplan van de vogel. Goed inzicht in de opbouw van de lichaamsholten van de vogel is essentieel voor het goed kunnen uitvoeren van lichamelijk onderzoek en het toedienen van medicamenten.

De vogel is een integraal onderdeel van het curriculum Diergeneeskunde en is ook één van de doeldiersoorten binnen het biomedische onderwijs zowel als mogelijk proefdier als vanuit een evolutionair perspectief.

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 kippen worden gedood via een directe injectie in het foramen magnum met een overdosis barbituraat. We hebben ervaring met deze methode van euthanasie (jaarlijks 120 kippen), die weinig stress oplevert. Deze methode van euthanasie is overlegd met de IvD en de NVWA en akkoord bevonden.

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

Er beginnen per jaar 225 studenten diergeneeskunde en 175 studenten biomedische wetenschappen. De dissectiepractica kip worden gegeven in het eerste studiejaar van beide opleidingen. Vier studenten werken samen; één student leest de handelingen voor, een tweede maakt aantekeningen en de twee overigen

voeren de handeling uit. Deze taken rouleren gedurende het vier uur durende practicum. Indien er meer studenten bij de tafel staan, is de ervaring dat de student(en) die geen taak heeft (hebben) niet geconcentreerd mee doet (doen).

B. De dieren

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

Per jaar worden 110 kippen aangekocht bij een legkippenbedrijf. Het betreft hier kippen, aan het einde van de legperiode. Voor de studenten diergeneeskunde hebben we 60 kippen nodig: 57 voor de studenten, twee voor het voorsnijpreparaat en voorcollege en één voor instructie van de docenten en de student-assistenten. Voor het biomedisch onderwijs hebben we 47 kippen nodig; 44 voor de studenten, twee voor het voorsnijpreparaat en het voorcollege en één voor instructie van de docenten en studentassistenten. De overige drie kippen zijn in eerste instantie bedoeld als reserve. Bij kippen aan het eind van de legperiode komen relatief vaak purulente ontstekingen en afwijkingen van de lichaamsholte en eileider voor en zijn dan niet bruikbaar voor het vervolg van het practicum. Indien de reservekippen niet gebruikt worden tijdens het practicum, dan worden ze gebruikt voor het vervaardigen van preparaten/plastinaten t.b.v. de zelfstudie. Voor een periode van 5 jaar vragen we 550 kippen aan.

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.

Mochten er kippen surplus zijn, dan kunnen we die inzetten voor het practicum. Op dit moment is ons niet bekend of die dieren er zijn en wat de mogelijke voorgeschiedenis is.

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.

Tijdens het voorbereidende onderwijs bestuderen de studenten de anatomie (nomenclatuur en structuren via het tekstboek, de preparaten in het studielandschap en via voorgeprepareerde preparaten tijdens contactonderwijs). De preparaten die we hiervoor gebruiken zijn al jaren in ons bezit en worden keer op keer opnieuw gebruikt of zijn duurzaam gefixeerd (plastinatietechniek). Dit om ervoor te zorgen dat de voor dit onderwijs gedode dieren zo optimaal door de studenten worden gebruikt en alleen gewerkt hoeft te worden aan de hogere eindtermen die op een andere manier niet behaald kunnen worden.

Zoals uitgelegd onder 2A is meer studenten aan een tafel geen goede mogelijkheid, omdat voor de extra student(en) niet een duidelijke rol is en omdat daarvoor het kadaver te klein is. Tijdens de dissectie krijgen ze echt gevoel voor de 3D opbouw van de lichaamsholte, omdat dat het **enige** moment is, dat de studenten de luchtzakken en de septa die de lichaamsholte opdelen, kunnen waarnemen en de organen daardoorheen zien schemeren.

Er wordt gestreefd naar het gebruik van surplusdieren. Echter, ervaring is dat de kans hierop beperkt is.

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

De dieren worden op het bedrijf verzameld door de eigenaar. Direct na aankomst op de afdeling worden de dieren gedood door twee ervaren proefdiertechnici.

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?

Transport naar faculteit

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Vervoer in transportkratten

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

J. Humane eindpunten

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

X Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het onderwijs wordt uitgevoerd op dood materiaal

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

.

X Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Anatomie Master

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 dissectiepractica anatomie Master worden uitgevoerd op kort voor aanvang van het practicum geëuthanaseerde dieren. Na de dood worden de pony en het rund bevestigd in een metalen frame, het varken wordt op een tafel gelegd; alle kadavers worden gedurende één week koel bewaard, maar niet verder gefixeerd.

De docent/preparateur bereidt per dag het kadaver voor, waarna de studenten de blootgelegde structuren bestuderen en vervolgens zelf het mes hanteren om de diepere lagen vrij te prepareren. Binnen een week wordt het hele dier gebruikt. De studenten snijden in vers materiaal, waarvan de weefseleigenschappen meer met de echte situatie overeenkomen, dan wanneer het weefsel gefixeerd zou zijn.

In de Master diergeneeskunde bestuderen de studenten de diersoortspecifieke details van de diersoort van hun Master. Ze bestuderen de topografische relaties, wat inhoudt dat ze verbanden kunnen leggen tussen de locatie van een orgaan(systeem) en de benaderbaarheid voor klinisch onderzoek, de (on)mogelijkheid voor het verspreiden van ziekteprocessen en de koppeling van de diverse orgaansystemen binnen het lichaam.

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 dieren krijgen na voorafgaande sedatie een overdosis anestheticum. Bij het bereiken van voldoende anesthesiediepte (wat wordt gecontroleerd door controle van reflexen) wordt de arteria carotis communis gecannuleerd. Het dier verbloedt vervolgens via de geopende canule.

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

Het practicum wordt voor maximaal 25 personen gegeven. In de Master Paard zijn dat gemiddeld twee keer 16 studenten per jaar, in de Master Landbouwhuisdieren drie keer 22 studenten per jaar. Bij iedere instroom betreft het nieuwe studenten, die dit onderwijs nog niet gevolgd hebben; recidivisten die de toets niet gehaald hebben mogen niet meer actief participeren aan het onderwijs, maar mogen het wel bijwonen. Uit ervaring weten we dat het onderwijs aan paard en rund optimaal verloopt bij maximaal 20 studenten. Bij LH zijn vaak meer studenten aanwezig, maar deze verdelen zich over twee kadavers, nl. het varken en het rund. Het varken, meestal zo'n 60 kg, is niet groot genoeg voor 20 studenten, maar wel voor groepjes van vijf, die om de beurt prepareren. Alle LH studenten bestuderen zowel het rund als het varken.

B. De dieren

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

Per jaar hebben we nodig:

- Twee pony's, bij voorkeur kleine maat hengstjes via de handel.
- Drie runderen van het departement LH, dat de dieren voor ons aankoopt, bij voorkeur eerstekalfskoe, niet te groot met een redelijk ontwikkeld uier.
- Drie varkens van het proefbedrijf de Tolakker, bij voorkeur intacte beer met een geschat gewicht van 60 kg.

Voor een aanvraag voor 5 jaar betreft dit dus:

- 10 pony's
- 15 runderen
- 15 varkens

De pony's en de runderen moeten in het frame passen, vandaar de wens voor niet al te grote dieren. De keuze voor een hengstje is ingegeven omdat de testikels over het algemeen goed ontwikkeld zijn, maar het vrouwelijk geslachtsapparaat, inclusief het uier meestal weinig ontwikkeld zijn. Indien er een merrie voorhanden is, waarbij het uier goed ontwikkeld is, kan die ook gebruikt worden (maar die worden zelden aangeboden) Het is voor de studenten dan meer informatief om de aanhechting van het uier in een voorgeprepareerd lacterend uier te zien, dat we in de collectie hebben.

Dat laatste geldt ook voor de voorkeur voor een mannelijk varken (volwassen zeugen wegen 200 kg). Eerstekalfskoeien hebben een goed ontwikkeld uier en de speciale bloedvoorziening kan relatief eenvoudig in zo'n kadaver zichtbaar worden gemaakt.

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.

Indien er surplus wordt aangeboden, kan dit ingezet worden.

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.

Tijdens de ingeroosterde voorbereiding bestuderen de studenten de anatomie (nomenclatuur en structuren via het tekstboek, de preparaten in het studielandschap en via voorgeprepareerde preparaten tijdens contactonderwijs). De preparaten die we hiervoor gebruiken zijn al jaren in ons bezit en worden keer op

keer opnieuw gebruikt of zijn duurzaam gefixeerd (plastinatietechniek). Dit om ervoor te zorgen dat de voor dit onderwijs gedode dieren zo optimaal door de studenten worden gebruikt en alleen gewerkt hoeft te worden aan de hogere eindtermen die op een andere manier niet behaald kunnen worden.

De studenten bereiden zich hierop voor door de concepten door te nemen en het materiaal dat ter beschikking staat in het studielandschap te bestuderen. Gezien de grootte van de objecten is er minder materiaal voorhanden voor zelfstudie cq. voorbereiding dan voor de kleinere diersoorten. Dat betekent dat meer, ook 'lagere' doelstellingen behaald moeten worden tijdens dit onderwijs. De studenten hebben vijf middagen (Master LH) of vijf hele dagen (Master paard) om dit te bereiken. Dit onderwijs is dus cruciaal voor het verwerven van een totaal 3D inzicht, aangezien er bijna geen andere mogelijkheden zijn om deze structuren 3D aan te bieden. Het wordt twee keer (Master P) of drie keer (Master LH) aangeboden.

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 na een periode van acclimatisatie gesedeerd en 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.

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?

XX 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?

X Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

X Nee > Ga verder met vraag I.

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

toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Transport in normale veewagen naar faculteit diergeneeskunde

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

normale veewagen, daarna acclimatisatie

J. Humane eindpunten

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

X Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het practicum vindt plaats op dood materiaal.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|----------------|
| 3 | Fysiologie rat |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De rat wordt direct na aankomst op de practicumlocatie verdoofd en geëuthanaseerd middels cervicale dislocatie. Direct daarna worden het hart, een stuk dunne darm en een langzame en een snelle spier uitgenomen. De studenten doen hier in groepjes van 3 tot 4 studenten een aantal experimenten mee; ieder met hun eigen spiersoort in een aparte opstelling. Studenten werken nauw samen bij het opstellen van de hypothesen m.b.t. de farmacologische beïnvloeding van de drie spiersoorten (hart, glad en skelet), het verkrijgen van betrouwbare resultaten en het verklaren en mondeling presenteren van de uitkomsten. De rat wordt geëuthanaseerd door één van de medewerkers onder bijzijn van de studenten, voor wie het vaak de eerste keer is dat ze dit meemaken. Zij moeten hierop reflecteren en het verslag wordt opgenomen in hun portfolio *persoonlijke professionele ontwikkeling*.

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.

Direct na binnenkomst euthanasie met voorafgaande verdoving met isofluraan.

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

Per practicum zijn er 4 opstellingen waarvoor de spieren (hart, darm, snelle of langzame skeletspier) van 1 rat voor gebruikt worden. Er zijn 4 opstellingen met 1 spier, waar 3 tot 4 studenten aan samenwerken. Het vergroten van de practicumgroepen brengt met zich mee dat een aantal studenten als toeschouwer aanwezig zijn en niet zozeer als deelnemer. De effectiviteit van het onderwijs gaat dan verloren.

B. De dieren

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

per jaar hebben we 20 volwassen ratten nodig; surplus, geslacht niet van belang. We willen graag volwassen dieren, maar niet zwaarder dan 250 gram, omdat dan de spieren van een dusdanige grootte zijn dat ze in een opstelling langdurig te stimuleren zijn.

Dit practicum wordt georganiseerd voor groepen van maximaal 15 studenten. In het curriculum DGK stromen jaarlijks 225 studenten in, wat betekent dat we het practicum 15 keer per jaar aanbieden. Tevens wordt dit practicum georganiseerd voor het UCU; per groep zijn maximaal 30 studenten aanwezig, wat inhoudt dat we het practicum voor deze groep maximaal 2 keer aanbieden.

We vragen voor 5 jaar 100 ratten aan.

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.

We vragen om surplusratten. We weten niet wat er voorafgaand met deze dieren is gebeurd.

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.

Tijdens de Bachelor DGK wordt de meer algemene en orgaanspecifieke fysiologie behandeld. Dit onderwijs wordt opgebouwd door te starten met hoorcolleges voor de grote lijn en de uitleg aan de hele groep studenten. In de werkcolleges wordt waar mogelijk gerekend met voorbeelden en beredeneerd wat een mogelijk gevolg van een interventie is. Een aantal van deze interventies zijn basaal aanwezig in beschikbare e-learning programma's. Echter, er is nog geen mogelijkheid om hele specifieke digitale interventies te doen. Volgens de diverse onderwijstheorieën leren studenten het meest door zelf proefondervindelijk resultaten te genereren en dat geldt zeker voor de farmacologische beïnvloeding van spiercellen. De gebruikte spieren worden vers geoogst uit een kort daarvoor gedode rat en zo snel mogelijk in een opstelling gebracht.

Alternatieven zijn er nog niet. De beschikbare e-learning programma's gaan niet diep genoeg om de leerdoelen te bereiken. Het oogsten van de spieren uit kort daarvoor gedode ratten op een ander instituut blijkt door teveel tijdverlies (door transport) te snel te leiden tot functieverlies van de geoogste spieren, waardoor de studenten niet alle experimenten kunnen uitvoeren.

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.

sedatie bij euthanasie.

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?

X 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?

X Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

X Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Transport naar faculteit

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

X Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief

ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Verkrijgen van de spieren voor 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.

X Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|----------------|
| 3 | Fysiologie rat |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De rat wordt direct na aankomst op de practicumlocatie verdoofd en geëuthanaseerd middels cervicale dislocatie. Direct daarna worden het hart, een stuk dunne darm en een langzame en een snelle spier uitgenomen. De studenten doen hier in groepjes van 3 tot 4 studenten een aantal experimenten mee; ieder met hun eigen spiersoort in een aparte opstelling. Studenten werken nauw samen bij het opstellen van de hypothesen m.b.t. de farmacologische beïnvloeding van de drie spiersoorten (hart, glad en skelet), het verkrijgen van betrouwbare resultaten en het verklaren en mondeling presenteren van de uitkomsten. De rat wordt geëuthanaseerd door één van de medewerkers onder bijzijn van de studenten, voor wie het vaak de eerste keer is dat ze dit meemaken. Zij moeten hierop reflecteren en het verslag wordt opgenomen in hun portfolio *persoonlijke professionele ontwikkeling*.

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.

Direct na binnenkomst euthanasie met voorafgaande verdoving met isofluraan.

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

Per practicum zijn er 4 opstellingen waarvoor de spieren (hart, darm, snelle of langzame skeletspier) van 1 rat voor gebruikt worden. Er zijn 4 opstellingen met 1 spier, waar 3 tot 4 studenten aan samenwerken. Het vergroten van de practicumgroepen brengt met zich mee dat een aantal studenten als toeschouwer aanwezig zijn en niet zozeer als deelnemer. De effectiviteit van het onderwijs gaat dan verloren.

B. De dieren

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

per jaar hebben we maximaal 20 volwassen ratten nodig; surplus, geslacht niet van belang. We willen graag volwassen dieren, maar niet zwaarder dan 250 gram, omdat dan de spieren van een dusdanige grootte zijn dat ze in een opstelling langdurig te stimuleren zijn.

Dit practicum wordt georganiseerd voor groepen van maximaal 15 studenten. In het curriculum DGK stromen jaarlijks 225 studenten in, wat betekent dat we het practicum 15 keer per jaar aanbieden, waarvoor we 15 ratten gebruiken. Tevens wordt dit practicum georganiseerd voor het UCU; per groep zijn maximaal 30 studenten aanwezig, wat inhoudt dat we het practicum voor deze groep maximaal 2 keer aanbieden en dus 2 ratten gebruiken. De practica van de bovengenoemde opleidingen worden in verschillende semesters geroosterd; voorafgaand testen de we opstelling met 1 rat, waarbij we ook direct de opleiding van de jaarlijks nieuwe practicumdocenten verzorgen. Heel soms lukt stimuleren niet (door onbekende oorzaak), om die reden vragen we 1 reserve rat aan. In totaal zijn dit maximaal 20 ratten per jaar en vragen we voor 5 jaar maximaal 100 ratten aan.

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.

We vragen om surplusratten. We weten niet wat er voorafgaand met deze dieren is gebeurd.

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.

Tijdens de Bachelor DGK wordt de meer algemene en orgaanspecifieke fysiologie behandeld. Dit onderwijs wordt opgebouwd door te starten met hoorcolleges voor de grote lijn en de uitleg aan de hele groep studenten. In de werkcolleges wordt waar mogelijk gerekend met voorbeelden en beredeneerd wat een mogelijk gevolg van een interventie is. Een aantal van deze interventies zijn basaal aanwezig in beschikbare e-learning programma's. Echter, er is nog geen mogelijkheid om hele specifieke digitale interventies te doen. Volgens de diverse onderwijstheorieën leren studenten het meest door zelf proefondervindelijk resultaten te genereren en dat geldt zeker voor de farmacologische beïnvloeding van spiercellen. De gebruikte spieren worden vers geoogst uit een kort daarvoor gedode rat en zo snel mogelijk in een opstelling gebracht.

Alternatieven zijn er nog niet. De beschikbare e-learning programma's gaan niet diep genoeg om de leerdoelen te bereiken. Het oogsten van de spieren uit kort daarvoor gedode ratten op een ander instituut blijkt door teveel tijdverlies (door transport) te snel te leiden tot functieverlies van de geoogste spieren, waardoor de studenten niet alle experimenten kunnen uitvoeren.

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.

sedatie bij euthanasie.

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?

Transport naar faculteit

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

licht

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Verkrijgen van de spieren voor 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.

X Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	4	Keuzevak vis

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het doel van het keuzevak "Vis" is om studenten een solide basis mee te geven voor de praktijk. Deze basis houdt in dat studenten zelfstandig de gezondheidsstatus van een aquarium en een vijver, waarin vissen worden gehouden, kunnen beoordelen. Dit gebeurt aan de hand van het bepalen van de waterkwaliteit, de aard van de beplanting en de klinische aspecten van de vissen.

De reden waarom bij vissen meer standaardhandelingen worden verricht vergeleken bij andere huisdieren is, omdat een ziekte zich zeer snel kan verspreiden in een aquarium of vijver door de aard van het milieu en de vaak grote bevolkingsdichtheid, met als gevolg flinke uitvallen. Het is dus zeer belangrijk dat een dierenarts snel kan inschatten met welke ziekte hij/zij te maken heeft en welke maatregelen direct genomen moeten worden. Daarnaast vertonen dode vissen heel snel autolyse, waardoor de verdere diagnostiek bemoeilijkt wordt. Het opsturen van kadavers voor diagnostisch onderzoek is daardoor onder praktijkomstandigheden bijna ondoenlijk.

Dit houdt in dat een dierenarts ter plekke het meeste onderzoek zelf verricht, tevens weefselmonsters neemt, die zodanig behandeld worden om te versturen voor specialistisch diagnostisch onderzoek (virusdiagnostiek, histologisch onderzoek, bacteriekweek).

Vandaar dat bij het keuzevak vis zieke vissen van vishandelaren, die niet meer voor de verkoop kunnen gaan, gebruikt worden om deze vaardigheden onder de knie te krijgen.

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.

Bij aanvang van het onderwijs blijven de vissen in hun transportmedium waar eerst **(1)** het observeren van de zieke vissen en het noteren van uitwendig onderzoek (zwemgedrag, vorm van de vis, aspect ogen, vinnen en staart en verkleuring schubben plaatsvindt. De vissen worden dus nog niet aangeraakt. Dit deel

van het onderzoek duurt 5 a 10 minuten. Daarna neemt iedere student met **(2)** een visnet een vis uit de vervoersbak en plaatst deze over in een kleinere bak. Het vangen duurt 2 – 5 sec. Daarna wordt het anesthesiemiddel **(5)** aan het water toegevoegd. Dit gebeurt onder supervisie van de docenten en begeleiders. Na 10 min. wordt door de docenten gecontroleerd of de vissen voldoende diep onder anesthesie zijn. Een docent demonstreert het afnemen van het bloed uit de staartvene **(3)** en het doorsnijden van het ruggenmerg achter de kop **(4)**. Vervolgens doet iedere student hetzelfde bij de eigen vis, wederom onder supervisie van de docenten en begeleiders. Terwijl de eerste groep vissen onder narcose gaat, wordt door een docent euthanasie door overdosis anesthesiemiddel gedemonstreerd. Daarna haalt iedere student, ook weer met een schepnet **(2)**, de tweede vis uit de vervoersbak en zet deze over in een kleinere bak, waarna een overdosis anesthesiemiddel toegediend wordt **(5)**. Na 10 min. controleren de docenten of de vissen gestorven zijn. Na euthanasie wordt er postmortaal onderzoek op de vissen verricht door de studenten onder toezicht van de docenten.

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

Twee vissen per student. De organen van de siervissen zijn te klein om alle diagnostische handelingen op één vis te kunnen uitvoeren cq. oefenen. De handelingen worden eerst door de docent gedemonstreerd en daarna door de studenten uitgevoerd. Aangezien er minimaal 20 en maximaal 25 studenten aan het onderwijs deelnemen en er 2 vissen gebruikt worden voor demonstratie van de procedures, zijn er minimaal 42 en maximaal 52 vissen per jaar nodig voor dit onderwijs. Dit betekent dat voor 5 jaar de aanvraag 260 vissen betreft.

B. De dieren

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

Maximaal 52 zieke siervissen per jaar verkregen via vishandelaren. Indien voorhanden kan het onderwijs ook uitgevoerd worden met zieke vissen uit de visindustrie.

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 de opzet van het keuzevak worden de studenten optimaal voorbereid om de handelingen uit te voeren. De studenten krijgen eerst onderwijs in de anatomie en fysiologie, de pathologie en de klinische diagnostiek, voordat handelingen op de dieren worden uitgevoerd.

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 studenten krijgen maximaal twee vissen voor hun onderzoek. Het bloedprikken en het kieuwmonster worden onder algehele anaesthesie uitgevoerd. De vissen worden uiteindelijk tijdens de algehele anesthesie gedood. Ons inziens is het transport de meest stressvolle handeling. De docenten halen de vissen zelf op in een transportmedium. Er wordt van te voren een inschatting gemaakt door de docenten (dierenartsen) hoe ziek de dieren zijn; te zieke dieren worden niet mee genomen.

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?

Transport naar de faculteit diergeneeskunde wordt verzorgd door de docenten zelf. De vissen worden getransporteerd in een aangepast transportmedium.

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?

Transport naar de faculteit

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 vissen worden in een transportmedium geplaatst en het vervoer wordt begeleid door een dierenarts.

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

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De vissen zijn ziek en niet meer geschikt voor de verkoop. Dat is de reden dat we ze als UU kunnen overnemen en inzetten in het onderwijs.

Een leerdoel van het onderwijs is het leren euthanaseren van vissen en vervolgens om sectie uit te voeren op de vissen. Dit is een handeling die de studenten moeten kunnen uitvoeren, omdat i.v.m. snelle autolyse het opsturen van vissen ter sectie niet mogelijk is. Monsternamen geschiedt door de lokale dierenarts, zodat het materiaal snel in formaline gefixeerd kan worden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		4	Keuzevak vis

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het doel van het keuzevak "Vis" is om studenten een solide basis mee te geven voor de praktijk. Deze basis houdt in dat studenten zelfstandig de gezondheidsstatus van een aquarium en een vijver, waarin vissen worden gehouden, kunnen beoordelen. Dit gebeurt aan de hand van het bepalen van de waterkwaliteit, de aard van de beplanting en de klinische aspecten van de vissen.

De reden waarom bij vissen meer standaardhandelingen worden verricht vergeleken bij andere huisdieren is, omdat een ziekte zich zeer snel kan verspreiden in een aquarium of vijver door de aard van het milieu en de vaak grote bevolkingsdichtheid, met als gevolg flinke uitvallen. Het is dus zeer belangrijk dat een dierenarts snel kan inschatten met welke ziekte hij/zij te maken heeft en welke maatregelen direct genomen moeten worden. Daarnaast vertonen dode vissen heel snel autolyse, waardoor de verdere diagnostiek bemoeilijkt wordt. Het opsturen van kadavers voor diagnostisch onderzoek is daardoor onder praktijkomstandigheden bijna ondoenlijk.

Dit houdt in dat een dierenarts ter plekke het meeste onderzoek zelf verricht, tevens weefselmonsters neemt, die zodanig behandeld worden om te versturen voor specialistisch diagnostisch onderzoek (virusdiagnostiek, histologisch onderzoek, bacteriekweek).

Vandaar dat bij het keuzevak vis zieke vissen van vishandelaren, die niet meer voor de verkoop kunnen gaan, gebruikt worden om deze vaardigheden onder de knie te krijgen.

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.

Bij aanvang van het onderwijs blijven de vissen in hun transportmedium waar eerst **(1)** het observeren van de zieke vissen en het noteren van uitwendig onderzoek (zwemgedrag, vorm van de vis, aspect ogen, vinnen en staart en verkleuring schubben plaatsvindt. De vissen worden dus nog niet aangeraakt. Dit deel

van het onderzoek duurt 5 a 10 minuten. Daarna neemt iedere student met **(2)** een visnet een vis uit de vervoersbak en plaatst deze over in een kleinere bak. Het vangen duurt 2 – 5 sec. Daarna wordt het anesthesiemiddel **(5)** aan het water toegevoegd. Dit gebeurt onder supervisie van de docenten en begeleiders. Na 10 min. wordt door de docenten gecontroleerd of de vissen voldoende diep onder anesthesie zijn. Een docent demonstreert het afnemen van het bloed uit de staartvene **(3)** en het doorsnijden van het ruggenmerg achter de kop **(4)**. Vervolgens doet iedere student hetzelfde bij de eigen vis, wederom onder supervisie van de docenten en begeleiders. Terwijl de eerste groep vissen onder narcose gaat, wordt door een docent euthanasie door overdosis anesthesiemiddel gedemonstreerd. Daarna haalt iedere student, ook weer met een schepnet **(2)**, de tweede vis uit de vervoersbak en zet deze over in een kleinere bak, waarna een overdosis anesthesiemiddel toegediend wordt **(5)**. Na 10 min. controleren de docenten of de vissen gestorven zijn. Na euthanasie wordt er postmortaal onderzoek op de vissen verricht door de studenten onder toezicht van de docenten.

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

Twee vissen per student. De organen van de siervissen zijn te klein om alle diagnostische handelingen op één vis te kunnen uitvoeren cq. oefenen. De handelingen worden eerst door de docent gedemonstreerd en daarna door de studenten uitgevoerd. Aangezien er minimaal 20 en maximaal 25 studenten aan het onderwijs deelnemen en er 2 vissen gebruikt worden voor demonstratie van de procedures, zijn er minimaal 42 en maximaal 52 vissen per jaar nodig voor dit onderwijs. Dit betekent dat voor 5 jaar de aanvraag 260 vissen betreft.

B. De dieren

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

Maximaal 52 zieke siervissen per jaar verkregen via vishandelaren. Indien voorhanden kan het onderwijs ook uitgevoerd worden met zieke vissen uit de visindustrie.

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.

Het keuzevak is zodanig opgezet dat de studenten optimaal voorbereid de handelingen gaan uitvoeren. Door dit vak alleen aan te bieden als keuzevak voor de echt geïnteresseerde student (max. 25 studenten per jaar) voorkomen we onnodig inzet van dieren. Er is helaas geen model voorhanden, waarmee de diagnostische handelingen gesimuleerd kunnen worden. Wel is er altijd 'live' demonstratie door de docenten voordat de studenten zelf aan de slag mogen. Aangezien we vaak de beschikking hebben over kleinere siervissen, zijn er voor de studenten 2 vissen per persoon nodig om alle handelingen te kunnen oefenen. Soms kunnen we vissen uit de kweekindustrie overnemen; we reduceren het aantal vissen dan tot 1 vis per 2 studenten.

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 studenten krijgen maximaal twee vissen voor hun onderzoek. Het bloedprikken en het kieuwmonster worden onder algehele anaesthesie uitgevoerd. De vissen worden uiteindelijk tijdens de algehele anesthesie gedood. Ons inziens is het transport de meest stressvolle handeling. De docenten halen de vissen zelf op in

een transportmedium. Er wordt van te voren een inschatting gemaakt door de docenten (dierenartsen) hoe ziek de dieren zijn; te zieke dieren worden niet mee genomen.

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?

Transport naar de faculteit diergeneeskunde wordt verzorgd door de docenten zelf. De vissen worden getransporteerd in een aangepast transportmedium.

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?

Transport naar de faculteit

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 vissen worden in een transportmedium geplaatst en het vervoer wordt begeleid door een dierenarts.

J. Humane eindpunten

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

X Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De vissen zijn ziek en niet meer geschikt voor de verkoop. Dat is de reden dat we ze als UU kunnen overnemen en inzetten in het onderwijs.

Een leerdoel van het onderwijs is het leren euthanaseren van vissen en vervolgens om sectie uit te voeren op de vissen. Dit is een handeling die de studenten moeten kunnen uitvoeren, omdat i.v.m. snelle autolyse het opsturen van vissen ter sectie niet mogelijk is. Monstername geschiedt door de lokale dierenarts, zodat het materiaal snel in formaline gefixeerd kan worden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



> 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
AVD1080020171004

Bijlagen

2

Datum 16 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 maart 2017. Het gaat om uw project "Onderwijs departement Pathobiologie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1080020171004. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

16 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020171004

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
16 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171004

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Faculteit Diergeneeskunde, Departement Pathobiologie
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Datum:
16 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171004

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Faculteit Diergeneeskunde, Departement Pathobiologie
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 september 2017
Geplande einddatum: 31 augustus 2022
Titel project: Onderwijs departement Pathobiologie
Titel niet-technische samenvatting: Onderwijs departement Pathobiologie
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500, 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.584,-
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:

13 maart 2017

Datum:

16 maart 2017

Aanvraagnummer:

080020171004



> 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
AVD1080020171004
Bijlagen
2

Datum 16 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 maart 2017
Vervaldatum: 15 april 2017
Factuurnummer: 171004
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1080020171004	€ 1.584,00

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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.I.808.002
2. Titel van het project : Onderwijs departement Pathobiologie
3. Titel van de NTS : Onderwijs diergeneeskunde en biomedische wetenschappen

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: 21-12-2016
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 01-02-2017
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 07-02-2017/17-02-2017
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 01-03-2017

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: 07-02-2017
- Datum antwoord: 17-02-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Bijlage 4

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC mist hier een beschrijving van de beoogde behandelingen (in plaats daarvan staat vermeld welke vaardigheden de studenten op moeten doen). Er zou echter aangegeven moeten worden welke handelingen de vissen achtereenvolgens ondergaan. Bijvoorbeeld: "onder anesthesie brengen door een anestheticum aan het water toe te voegen, uit het water halen, een aantal schubben afschrapen, doden door decapitatie gevolgd door "pithing", of iets van vergelijkbare strekking. Graag nog vermelden.

De tekst is aangepast.

Niet Technische Samenvatting

- 3.3 Diersoort en geschatte aantallen: De DEC constateert een discrepantie in de genoemde aantallen. Hier staat genoemd dat 20 ratten nodig zijn, maar dit zijn er 100 (voor 5 jaar).

Dit is aangepast.

- 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.

In het departement Pathobiologie van de faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht wordt onderwijs gegeven t.b.v. de opleiding Diergeneeskunde (zowel Bachelor als Master), de opleiding Biomedische Wetenschappen en binnen het Science department van het University College Utrecht (UCU). Het betreft onderwijspractica in de vakken Anatomie, Fysiologie en Pathologie, welke allen een belangrijke basis vormen voor de opleiding van dierenartsen, biomedici en artsen. De ratio van het vak anatomie is het basis 'bouwplan' begrijpen van vogels en zoogdieren en de aanpassingen hierop, die noodzakelijk zijn voor het verteren van bijvoorbeeld planten of het kunnen bewegen op oneffen bodem. Kennis van de anatomie is

tevens van belang voor het begrijpen van de relatie tussen vorm (hoe ziet het eruit) en functie (hoe werkt het). Hiertoe zijn een tweetal dissectiepractica opgesteld: een met kippen en een met pony's, runderen en varkens. De fysiologie houdt zich bezig met alle processen in een cel, weefsels, organen en/of het hele lichaam en hoe die beïnvloed kunnen worden door normaal optredende activiteiten, zoals vertering of beweging. Tijdens het hierbij behorende practicum *farmacologische beïnvloeding spierfunctie* bestuderen de studenten de werking van 4 soorten spieren: twee soorten skeletspieren (waarvan één zogenaamde langzame en één snelle), het hart en een stuk darm. Het practicum pathologie omvat ziekteleer; in deze onderwijsaanvraag specifiek de ziekteleer van vissen. Studenten zullen de gezondheidsstatus van een aquarium en/of vijver, waarin vissen worden gehouden, beoordelen, het klinisch beeld van de vissen beoordelen d.m.v. observatie en enkele handelingen verrichten.

Het einddoel van de verschillende onderwijspractica zijn leerdoelen die behoren tot de eindtermen van de curricula van diergeneeskunde, biomedische wetenschappen en UCU. De relatie tussen het hoofddoel en de leerdoelen is helder en vergelijkbaar met voorbeeld 5 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 onderwijsdoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om studenten diergeneeskunde, biomedische wetenschappen en science van het University College Utrecht kennis te laten maken en/of te trainen in het uitvoeren van anatomische, fysiologische en pathologische vaardigheden die van belang zijn in het kader van deze opleidingen. Het uiteindelijke doel van het project is het opleiden van (1) Biomedici en artsen in het verrichten van dierproeven, het verkrijgen van betrouwbare resultaten en het correct interpreteren van deze resultaten, alsmede ethische normbesef en het respectvol omgaan met dierlijk materiaal en (2) dierenartsen om de gezondheid en het welzijn van dieren te bewaken, te bevorderen en te verbeteren. Door deze vaardigheden tijdens de opleiding onder gecontroleerde omstandigheden te oefenen op onderwijsdieren worden studenten goed voorbereid op het toepassen van deze vaardigheden onder praktijkomstandigheden – zowel tijdens de studie als tijdens de beroepsuitoefening. 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 onderwijsproject zijn: de proefdieren en de studenten. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren kunnen, als gevolg van de handelingen die ze ondergaan, korte tijd stress ondervinden. In het kader van het onderwijs zullen de dieren gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de studenten geldt dat het kennis maken met en/of trainen van nieuwe vaardigheden bijdraagt aan hun wetenschappelijke scholing en verdere loopbaan

mogelijkheden, maar dit dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de docenten en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de onderwijsdoelstellingen 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.
8. De opzet van het project sluit logisch en helder aan bij de aangegeven onderwijsdoelstellingen en kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het onderwijs. In de onderwijsaanvraag is helder uiteengezet op welke manier het onderwijs – van de opleiding diergeneeskunde, biomedische wetenschappen en science in het algemeen, en met betrekking tot de pathobiologie in het bijzonder – is opgebouwd, en welke plaats de beschreven practica en type dierproeven daarbij innemen. Ook de ratio van (de fasering van) de verschillende type dierproeven is duidelijk toegelicht. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de onderwijsdoelstelling binnen de gevraagde termijn te realiseren.

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)

In bijlage 1, 2 en 3 worden, indien mogelijk, surplus dieren gebruikt, waarmee wordt bijgedragen aan de vermindering van het aantal "dieren in voorraad gedood". De aanvrager voldoet aan de in de Wet op de dierproeven genoemde beperkende voorwaarden voor hergebruik.

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 maximale ongerief in alle bijlagen is ingeschat als licht. In bijlagen 1, 2 en 3 kunnen de dieren stress ondervinden als gevolg van het transport. Na binnenkomst worden de dieren, al dan niet na een acclimatiseringsperiode, geëuthanaseerd. In bijlage 4 worden zieke dieren aangekocht, als gevolg waarvan, naast stress door het transport, ook licht ongerief kan optreden. Deze dieren worden eerst geanestheseerd t.b.v. het afnemen van bloed, het maken van een huidafkrabbel en het nemen van een kieuwmonster, waarna de dieren worden geëuthanaseerd.
12. De integriteit van de dieren wordt in fysiek opzicht in beperkte mate aangetast vanwege het verdoven/het onder anesthesie brengen van de dieren en het aansluitend doden van de dieren.
13. Omdat de dieren kort na aankomst (bijlagen 1 t/m 3) bij de onderwijsfaciliteit, of na enkele handelingen (bijlage 4) gedood worden, worden geen humane eindpunten verwacht.

3V's

14. Om dierenartsen in de volle breedte toe te rusten voor de preventieve en curatieve diergezondheidszorg is het van groot belang dat zij tijdens de opleiding kennis maken en ervaring opdoen met handelingen bij zowel levende als gedode gezonde en zieke dieren. De handelingen die tijdens de practica aan bod komen zijn essentieel voor de latere beroepsuitoefening. Voor andere biomedici geldt dat zij veelal werkzaam zullen zijn in wetenschappelijk onderzoek gericht op het verkrijgen van inzicht in- en ontwikkelen van therapieën voor aandoeningen bij mens en dier. Ook daarvoor is praktische kennis van anatomie, fysiologie en pathologie van groot belang. Er zijn geen volwaardige alternatieven beschikbaar die het onderwijs met levende en "vers" gedode dieren kunnen vervangen.
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. Om een optimaal onderwijsrendement te behalen en toch zo weinig mogelijk dieren te gebruiken, wordt het aantal studenten per dier nauwkeurig afgestemd op het onderwijsdoel. De berekening van het aantal benodigde dieren is gebaseerd op het aantal studenten dat jaarlijks instroomt, het aantal studenten dat met het oog op de onderwijsdoelstelling per keer aan een practicum kan deelnemen en het aantal keren dat een practicum plaats kan vinden. Waar mogelijk worden surplusdieren uit onderwijs of onderzoek ingezet, of dieren die in het kader van de reguliere veehouderij/handel gedood moeten worden op het bedrijf van herkomst, bijvoorbeeld vanwege ziekte.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het onderwijs is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er worden technische hulpmiddelen gebruikt om studenten goed voor te bereiden

op de practica waarin zij met dieren werken, en bij een aantal practica is het met goed gevolg afleggen van een ingangstoets verplicht.

In bijlage 1 is gekozen voor de kip omdat dit de enige vogelsoort is die integraal behandeld wordt in het onderwijs. Verder is de kip groot genoeg om alle belangrijke structuren te bestuderen. Voor het practicum Anatomie Master worden pony's, varkens en runderen gebruikt. Dit betreffen diersoorten die behoren tot het onderwerp van de Master die de studenten gekozen hebben en zijn dus de doeldieren. Voor het practicum *farmacologische beïnvloeding spierfunctie* in bijlage 3 worden ratten gebruikt omdat de spieren van de rat groot genoeg zijn om in de opstelling gemonteerd te worden en om leesbare uitslagen te geven na stimulatie. In bijlage 4 is het doeldier de vis. Er is gekozen voor het gebruik van zieke siervissen, maar indien beschikbaar zouden ook zieke kweekvissen kunnen worden gebruikt.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er zullen in bijlage 1 alleen vrouwelijke dieren (kippen) gebruikt worden. De kippen worden aangekocht bij een legkippenbedrijf en zijn derhalve voorhanden zonder dat een overschot aan hanen ontstaat als gevolg van het gebruik van uitsluitend vrouwelijke dieren. In bijlage 2 gaat de voorkeur uit naar hengsten, eerstekalfskoeien en jonge mannelijke varkens. De keuze voor hengsten houdt verband met het feit dat de testikels over het algemeen goed ontwikkeld zijn, in tegenstelling tot het vrouwelijk geslachtsapparaat en de uier. Indien er een merrie voorhanden is, waarbij het uier goed ontwikkeld is, kan die ook gebruikt worden. Vanwege dezelfde reden wordt ook de voorkeur gegeven aan jonge mannelijke varkens. De keuze voor eerstekalfskoeien houdt verband met het feit dat zij een goed ontwikkelde uier hebben en de speciale bloedvoorziening relatief eenvoudig in een kadaver van dit dier zichtbaar kan worden gemaakt. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de onderwijsdoelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om bepaalde practica alleen met vrouwelijke dan wel mannelijke dieren uit te voeren. De DEC acht het in dit specifieke geval ook niet aannemelijk dat daardoor ongebruikte overschotten van dieren van het andere geslacht zullen ontstaan.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood om de doelstellingen van het onderwijsproject te behalen. In bijlage 1 en 2 kunnen de doelstellingen alleen behaald worden met behulp van dood materiaal. In bijlage 3 worden de dieren gedood voor het verkrijgen van de spieren voor ex-vivo experimenten en in bijlage 4 is één van de leerdoelen het euthanaseren van vissen en het uitvoeren van sectie. Daarnaast gaat het om zieke vissen die niet meer geschikt zijn voor de verkoop. De dieren worden volgens een, in bijlage IV van de EU richtlijn vermelde, passende methode gedood.
20. Omdat in bijlage 3 ratten en bijlage 4 vissen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik hier niet van toepassing. In bijlage 1 worden kippen aangevraagd en in

bijlage 2 pony's, runderen en varkens, maar omdat het doel van deze bijlagen is de anatomie van de dieren te bestuderen is het noodzakelijk de dieren te doden. Hergebruik of herplaatsing van deze dieren is derhalve niet mogelijk.

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 onderwijs, namelijk om studenten kennis te laten maken en/of te trainen in het uitvoeren van anatomische, fysiologische en pathologische vaardigheden die van belang zijn in het kader van deze opleidingen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een geringe aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met licht ongerief. Daar staat tegenover dat deze practica een belangrijke bijdrage leveren aan de wetenschappelijke kennis en de ontwikkeling van studenten en een onmisbaar onderdeel van de opleiding vormen.
Goed opgeleide en dierenartsen, met kennis van de anatomie en pathologie, zijn niet alleen van belang voor de dieren, maar ook voor de samenleving. Voor dierenartsen ligt er bijvoorbeeld ook een belangrijke rol bij de detectie van zoonoses en de relatie met de humane geneeskunde en antibioticaresistentie. De DEC kent hier veel gewicht aan toe. Voor biomedici geldt dat zij veelal werkzaam zullen zijn in wetenschappelijk onderzoek gericht op het verkrijgen van inzicht in- en ontwikkelen van therapieën voor aandoeningen bij mens en dier. Ook daarvoor is praktische kennis van anatomie, fysiologie en pathologie van groot belang en de DEC kent daar dus veel gewicht aan toe.
Het is aannemelijk dat de leerdoelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de docenten doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Waar mogelijk worden surplus dieren ingezet.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat de handelingen die tijdens de practica aan bod komen essentieel zijn voor de latere beroepsuitoefening en dat derhalve dit onderwijs een substantieel belang vormt dat opweegt tegen de geringe 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

AVD1080020171004

Datum 28 maart 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 15 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderwijs departement Pathobiologie" met aanvraagnummer AVD1080020171004. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

De NTS is erg lang en uitgebreid. Als stelregel geldt dat een NTS maximaal rond de 500 woorden bevat. Uw NTS bestaat momenteel uit ongeveer 1500 woorden. Kunt u een nieuwe NTS sturen, die korter is? Het is hierbij niet noodzakelijk iedere Bijlage apart te benoemen onder de doelstelling en de 3V's; een samenvatting van alle Bijlagen is voldoende. Ook wordt u verzocht afkoringen van studierichtingen niet op te nemen.

Daarnaast is uw NTS niet anoniem is, omdat de opleiding Diergeneeskunde op 1 plek in Nederland wordt gegeven. Hoewel dit wellicht moeilijk te vermijden is, willen wij u hier wel op wijzen.

Onduidelijkheden

Kunt u het aantal dieren voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 toelichten?

Kunt u de 3V's van Bijlage Dierproeven 3.4.4.4 beter beschrijven?

Kunt u daarnaast verduidelijken of voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.4 er sprake is van een dodingsmethode die wel of niet valt onder bijlage IV van de richtlijn? U geeft een onderbouwing van de dodingsmethode onder 'nee', maar

de 'ja' is aangekruist.

Voor beide ontvangen wij graag een nieuwe Bijlage Dierproeven.

Datum:

28 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020171004

Leges

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

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting



Universiteit Utrecht

Bezoekadres: Yalelaan 1, Utrecht

Postadres: PB, P.O. Box 80158, NL-3508 TD Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

Faculteit Diergeneeskunde

Departement Pathobiologie

Divisie Anatomie & Fysiologie

Datum

3 april 2017

Onderwerp

Ref: AVD1080020171004

Ons kenmerk

CW/TS 03-04-2017

Telefoon

[Redacted]

E-mail

[Redacted]

L.S.,

Op 28 maart 2017 ontvingen we uw feedback op onze aanvraag voor een projectvergunning dierproeven met als titel "Onderwijs departement Pathobiologie" met aanvraagnummer AVD1080020171004.

U gaf aan dat er nog enkele onduidelijkheden in onze aanvraag waren. In deze brief leest u ons antwoord.

De Niet-Technische samenvatting is sterk ingekort tot minder dan 600 woorden en waar mogelijk geanonimiseerd.

In de bijlage 3.4.4.3 (Fysiologie rat) is het aantal dieren dat we maximaal aanvragen toegelicht; voor de 2 onderwijsmomenten gebruiken we 17 dieren, voor het opstellen en inregelen van de apparatuur 1 dier per onderwijsmoment; hiermee vindt tevens de instructie plaats van de practicumdocenten. Eén dier vragen we aan als reserve, aangezien het een enkele keer niet lukt om tot uitslagen te komen. Totaal komen we dan op 17 + 2 + 1 is 20 per jaar, dus voor 5 jaar is dat 100 dieren.

De beschrijving van de 3V's is aangepast in Bijlage 3.4.4.4 (Keuzevak vis). De handelingen zijn voorbereid door voorafgaand onderwijs, worden voorgedaan door de docenten, waarna de studenten zelf aan de slag gaan. We gebruiken minder vissen als er grotere vissen ter beschikking komen. Echter, de beschikbaarheid daarvan, valt op voorhand niet te voorspellen.

In bijlage 3.4.4.1 (anatomie kip) was er een dubbeling bij de dodingsmethode: dit is aangepast. De dieren worden gedood met een overdosis narcoticum, zoals aangegeven in bijlage IV van de richtlijn.

De betaling van de leges wordt geregeld door de IvD.

De gewijzigde bijlagen zijn bijgevoegd bij deze brief.

Met vriend

[Redacted signature block]



> 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
AVD1080020171004

Bijlagen

1

Datum 10 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderwijs departement Pathobiologie" met aanvraagnummer AVD1080020171004. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 3 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS en nieuwe Bijlagen Dierproeven vanwege onduidelijkheden omtrent de aantallen en de 3V's.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Onderwijs departement Pathobiologie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus 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 1 maart 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:
10 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171004

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

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 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Onderwijs departement Pathobiologie" met aanvraagnummer AVD1080020171004, 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 15 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 3 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 maart 2017, ontvangen op 15 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 3 april 2017

Aanvraagnummer:
AVD1080020171004

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Anatomie kip				
	Kippen /	550	Licht	
3.4.4.2 Anatomie Master				
	Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae) / pony's	10	Licht	
	Runderen (Bos taurus) /	15	Licht	
	Varkens (Sus scrofa domesticus) /	15	Licht	
3.4.4.3 Fysiologie rat				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	100	Licht	
3.4.4.4 Keuzevak vis				
	Andere vissen (andere Pisces) /	260	Licht	

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

Aanvraagnummer:
AVD1080020171004

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:
AVD1080020171004

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:

AVD1080020171004

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-09										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20171005	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x			x		
4	Bijlage animal procedure				x			x		
5	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x		
6	DEC advies				x		x	x		
7	Advies CCD		x						x	
8	Beschikking en vergunning				x		x	x		



22 MAART 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 of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30275924
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Universitair Docent
		Afdeling	Fac. Diergeneeskunde, Dpt. Landbouwhuisdieren
		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	Promovendus
		Afdeling	Fac. Diergeneeskunde, Dpt. Landbouwhuisdieren
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 6 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 6 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Dynamiek van darmmicrobiota binnen en tussen hokken met vleeskuikens en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderlinge beïnvloeding van de darmflora bij vleeskuikens binnen en tussen hokken en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven.
- 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 € 1.035,- Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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


6 Ondertekening


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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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


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

Naam 

Functie 

Plaats Utrecht

Datum 14/12/2017

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.
- 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.

Bij mensen is, onder andere mede dankzij het NIH Common Fund Human Microbiome Project, duidelijk geworden hoe belangrijk bacteriën in de darm kunnen zijn voor de algemene gezondheid. Ook voor vleeskuikens geldt dat darmkolonisatie met microbiota (vooral darmbacteriën), direct na uitkomst uit het ei, bepalend is voor veel essentiële levensprocessen van vleeskuikens. De samenstelling en diversiteit van het darmmicrobioom (=de verzameling darmmicrobiota), beïnvloedt de ontwikkeling van het immuunsysteem en efficiëntie in voerbenutting voor ontwikkeling en groei in vleeskuikens (Kohl et al., 2012: J Comp Physiol B. 182(5):591-602). De samenstelling van de darmmicrobiota wordt bepaald door vele interacties tussen gastheer en omgevingsfactoren en varieert binnen en tussen koppels vleeskuikens (Wei et al., 2013: Poult Sci. 92(3):671-83). Deze variatie is geassocieerd met verschillen in productieprestaties en kunnen worden beïnvloed door aanpassingen in het voer (Stanley et al., 2012: Appl Microbiol Biotechnol. 96(5):1361-9). Verstoringen van de microbiota samenstelling gaan meestal gepaard met veranderingen in de regulatie van het immuunsysteem, hierdoor verandert het immunologische evenwicht in de darm en dit vergroot de gevoeligheid op infecties met bepaalde pathogenen (Smits et al., 2014:Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 23).

Vanuit overheden en de pluimvee-industrie wordt gestimuleerd dat diverse schakels in de pluimvee-industrie vooral streven naar 'gezonde, robuuste' dieren met het doel kwalitatief hoogstaande vleesproducten te produceren. Hieraan is gekoppeld dat de focus van onderzoek binnen R&D afdelingen en wetenschappelijke instellingen is verschoven naar genetische selectie, productiesystemen en diervoeders die de gezondheid en weerstand bevorderen. Gezondere koppels vleeskuikens hebben veel voordelen voor de dieren zelf, maar ook voor de consument van pluimveevlees. In een gezond koppel kippen zal het sterftepercentage lager zijn en zal het welzijn van de dieren beter zijn. Daarnaast zal een goede weerstand de kans op oplopen van infecties die bij de mens tot voedselinfecties kunnen leiden (zoals *Salmonella* en *Campylobacter*) verminderen. Ook zullen kippen die gezond zijn minder snel worden behandeld met antibiotica. Kortom, gezondere koppels pluimvee zorgen voor minder kans op overdracht van dierziekten of antibioticaresistentie van dier naar de mens via de consumptie van vlees. Deze studie maakt dan ook onderdeel uit van een door NWO

en een grote voerfabrikant gesubsidieerd onderzoeksproject, waarin het onderzoek naar het bewerkstelligen van een gunstige samenstelling van darmmicrobiota centraal staat. Het project is getiteld:

Binnen dit project zullen wij in experimenten met vleeskuikens gaan toetsen hoe, door middel van voerinterventies, de darmmicrobiota en het immuunsysteem gunstig beïnvloed kunnen worden. Hiervoor zijn goede diermodellen noodzakelijk. Experts van het immuunsysteem, partners in dit project, zullen *in vivo* en *in vitro* onderzoek doen om vooral de vroege afweer goed te kunnen bestuderen (projectvergunning in beoordeling). Wij zullen in de toekomstige diermodellen vooral de ontwikkeling van de darmmicrobiota in kaart gaan brengen. Hiervoor was de eerste stap om een veldstudie uit te voeren voor het ontwikkelen van een methode om darmmicrobiota in vleeskuikenkoppels te karakteriseren en de mate van variatie vast te stellen (reeds in uitvoering onder vergunning AVD108002016442).

Naast het beschikken over een methode om de darmmicrobiota te kunnen meten en interpreteren is het voor de opzet van voedingsproeven essentieel te weten welke andere factoren dan voer invloed hebben op darmmicrobiota. In de literatuur is te lezen dat de ontwikkeling van de darmmicrobiota, naast door voer, wordt bepaald door factoren zoals de genetische achtergrond (Zhao et al., 2013:Sci Reps (3):1163; Kim et al., 2015: Research in Veterinary Science (102):150-158), het geslacht (Lumpkins et al., 2008: Poultry Science(87):964-967), de leeftijd (Wielen et al., 2002: Microb Ecol (2002) 44:286.), strooisel management (Torok et al.,2009: Poult Sci(88):2474-2481) en de huisvesting (Guardia et al., 2011:Poult Sci(90):1878-1889). Er moet dus rekening gehouden worden met andere factoren dan alleen de voerinterventie bij microbiota studies (Laukens et al., 2016:FEMS Microbiol Rev 40(1):117-32). Zowel bij mensen, als bij muizen die samenwonen is aangetoond dat de darmmicrobiota meer op elkaar lijkt in verhouding met een groep individuen (Hildebrand et al., 2012 Genome Biology 14:R4; Schloss et al., 2014 Microbiome. Jul 21;2:25). De huisvesting van de dieren kan dus onbedoeld veel invloed hebben op de microbiota en dus op conclusies die je kunt trekken uit een proef. Ludvigsen et al. (2016:

Front. Vet. Sci. 3:16) toonden bijvoorbeeld aan dat de verschillen die gevonden werden in darmmicrobiota tussen vleeskuikens uit verschillende proefgroepen niet alleen aan het voer of de antibioticum behandeling toe te schrijven waren maar ook aan de stal waarin de dieren werden gehouden.

Eerder onderzoek (o.a. *Mechanisms underlying disease transmission between spatially separated animals*, PhD thesis van Bram van Bunnik, 2014: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/2060237>) wees ook al uit dat indirecte transmissie van bepaalde darmbacteriën tussen hokken, zoals *Campylobacter*, kan optreden. Dit onderzoek gaf aan dat er niet persé direct contact tussen de kippen nodig is voor overdracht van darmbacteriën, maar dat dit deels indirect, via de omgeving, kan plaatsvinden. Daarnaast is uit eerder onderzoek van onze eigen groep gebleken dat dieren [REDACTED] in de loop van de tijd [REDACTED] ten aanzien van [REDACTED]. Er ontwikkelde zich in de loop van de tijd een [REDACTED] van [REDACTED] bacteriën.

Het plan is om een deel van de toekomstige proeven in de voerproef-faciliteiten van onze consortium partner, een voerfabrikant, uit te voeren en een deel binnen onze faciliteiten aan de UU. Daarom willen we in deze dierproef groepen vleeskuikens met een zelfde herkomst simultaan houden in (aangrenzende) hokken (bij onze partner en in onze faciliteiten), op de standaard wijze waarop voerinterventies worden onderzocht, en [REDACTED] vergelijken ten aanzien van de ontwikkeling van de darmmicrobiota in de tijd.

Voor vervolgonderzoek is het belangrijk om te weten of, en in welke mate, er beïnvloeding van de microbiota optreedt in dezelfde ruimte. Dit kan namelijk grote invloed hebben op de conclusies die uit voerproeven getrokken worden. Daarom willen we in deze dierproef de methodische vraag onderzoeken over hoe de samenstelling van darmmicrobiota in vleeskuikens zich binnen en tussen hokken gedraagt, in de tijd en in afgezonderde groepen kuikens die elkaar onderling niet kunnen beïnvloeden [REDACTED] in vergelijking met groepen kuikens die elkaar onderling wel kunnen beïnvloeden (grondhokken). We zullen hierbij de mate van variatie van de microbiota samenstelling gaan meten.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Dit project voorziet in de behoefte om meer inzicht in de dynamiek van de darmmicrobiota te krijgen, zodat voerexperimenten kunnen worden geoptimaliseerd. Het doel van dit experiment is om te achterhalen of er minder variatie is tussen de samenstelling van de darmmicrobiota bij dieren gehuisvest in dezelfde ruimte in verhouding met dieren [REDACTED]. De hypothese is dat wanneer dieren in dezelfde ruimte leven er uitwisseling van de microbiota kan plaatsvinden welke effect kan hebben op de interpretatie van voerproeven.

Belangrijkste onderzoeksdoel is om te onderzoeken of de standaard opzet van voedingsexperimenten, met hokken in dezelfde ruimte, geschikt is voor het kunnen vaststellen van verschillen in microbiota samenstelling, en welke maatregelen te nemen zijn om de opzet te optimaliseren.

Een subdoel is dat deze experimenten tevens inzicht geven in de variatie van de darmmicrobiota samenstelling binnen en tussen hokken. Wat belangrijke input is voor wiskundige modellen die voor het overkoepelende project van belang zijn.

Een tweede subdoel is om verschillende monsternamemethoden uit te voeren opdat de uitkomsten ook inzicht kunnen geven over typen monsters die in toekomstige proeven genomen moeten worden

De volgende onderzoeksvragen willen we beantwoorden:

Onderzoeksvraag 1: Is er tussen hokken in een standaard voerproef setting onderlinge beïnvloeding van de darmmicrobiota samenstelling?

Onderzoeksvraag 2: Als er sprake is van onderlinge beïnvloeding, kan dit worden tegengegaan door het

Onderzoeksvraag 3: Als er sprake is van onderlinge beïnvloeding, kan dit door andere manieren van worden tegengegaan?

Onderzoeksvraag 4: Hoe vergelijkbaar zijn de microbiota van individuele dieren verkregen door het cloaca swabben met de microbiota verkregen door de darminhoud te bemonsteren?

Haarbaarheid:

Het project wordt uitgevoerd door een consortium van partijen met de benodigde expertise en infrastructuur om de doelen te bereiken.

- De haalbaarheid van de studie is ook door een externe subsidiegever getoetst, namelijk NWO. Zij beoordeelden het consortium als sterk en waren ervan overtuigd dat de beoogde doelen haalbaar waren en hebben daarom een omvangrijke subsidie toegekend.
- Voor het uitvoeren van de dierproeven is de benodigde infrastructuur ten aanzien van dierfaciliteiten en laboratoriumfaciliteiten uitgebreid voorhanden. Deze faciliteiten zijn veelvuldig succesvol ingezet in voorgaande experimenten met dezelfde of vergelijkbare pathogenen en diersoorten, zowel bij binnen onze faciliteiten (Universiteit Utrecht, UU) als bij onze consortiumspartner.
- De microbiota analyses worden uitgevoerd in samenwerking met het laboratorium voor microbiologie van Wageningen Universiteit waar al de kennis en expertise in huis is. Vanuit Wageningen is een statisticus betrokken en vanuit UU is een wiskundig modelleur betrokken bij de opzet en het analyseren van deze proef.
- Met de informatie die uit eerdere proeven van onze consortiumspartner zal een goede keus gemaakt kunnen worden voor de te toetsen 'voerinterventies', waarvan bekend is dat deze grote effecten hebben op de darmmicrobiota. Met deze voorkennis kan een voldoende groot verschil tussen groepen worden aangebracht zodat makkelijker onderlinge beïnvloeding tussen proefgroepen meetbaar zal zijn.

3.3 Belang

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

Uiteindelijk beogen de onderzoekers met het project, waar deze proeven onderdeel van uitmaken, bij te dragen aan een diervriendelijke, duurzame, economisch rendabele en gezonde pluimveehouderij, inclusief veilige en goede vleesproducten voor de consument.

Maatschappelijk belang:

Met de vleeskuikenhouderij gaat het gebruik van grote hoeveelheden antimicrobiële middelen gepaard. Hoewel een flinke reductie (65%) in antibioticumgebruik gerealiseerd is in de vleeskuikensector in 2015 ten opzichte van 2009 werd in 2015 nog steeds bij 34% van de reguliere vleeskuikenbedrijven antibiotica ingezet (Antibioticumgebruik pluimveesector in 2015, www.avined.nl). Digestieproblemen zijn een van de meest frequent gerapporteerde indicatie voor antibioticumgebruik bij pluimvee: 25% van alle behandelingen bij vleeskuikens wordt hiertegen ingezet. Goed functionerende darmmicrobiota zijn cruciaal voor een goede darmontwikkeling, ontwikkeling van het afweersysteem en benutting van het voer voor ontwikkeling en groei. Nieuwe kennis is noodzakelijk om het samenspel tussen verteringssysteem, darmmicrobiota, voeding en het afweersysteem enerzijds en gezondheid en productie van het dier anderzijds goed te begrijpen.

Als we dit beter begrijpen kunnen we met aanpassingen in het voer ervoor zorgen dat er een dusdanige samenstelling van darmmicrobiota ontstaat die zorgt voor:

a) een goede ontwikkeling van het immuunsysteem van het kuikens, zodat deze al vanaf jonge leeftijd kan optreden tegen ziekteverwekkers. Hiermee wordt ook de kans op het oplopen van infecties die bij de

mens tot voedselinfecties kunnen leiden (zoals *Salmonella* en *Campylobacter*) verminderd. Ook zullen kippen die gezond zijn minder snel worden behandeld met antibiotica. Gezondere koppels pluimvee zorgen dus voor minder kans op overdracht van dierziekten of antibioticaresistentie van dier naar de mens via de consumptie van vlees.

b) een goede en efficiënte benutting van het voer, waarbij de kuikens kunnen groeien volgens een gezond groeipatroon gedurende de productieronde die voldoende efficiënt is (goede omzetting van voer in groei) maar niet tot gezondheidsproblemen leidt. Een efficiënte groei is niet alleen vanuit bedrijfseconomisch oogpunt gunstig, maar ook belangrijk in het kader van het beperken van de koolstofvoetafdruk voor de productie van vlees en de belasting van het milieu als gevolg van de mestproductie.

Gezien de groeiende wereldbevolking is het belangrijk om bij te dragen aan duurzame en gezonde eiwitproductie. Het vleeskuiken is een bijzonder efficiënt dier voor de productie van vlees, voor iedere kilo vlees is maar 1.67 kilo voer nodig. De kennis van dit project zal bijdragen aan een duurzame en gezonde pluimveehouderij en hopelijk in de toekomst aan een nieuwe generatie diervoeders die de gezondheid van vleeskuikens bevordert en nog beter is afgestemd op de behoeften van het vleeskuiken. Dit betekent niet dat we na nastreven om de dieren nog sneller te laten groeien. Een pluimveehouderij met gezonde vleeskuikens draagt bij aan de veiligheid van voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong (verbetering volksgezondheid), een lagere ecologische voetafdruk van de vleeskuikenproductie, en de acceptatie van de vleeskuikenhouderij door de maatschappij.

Wetenschappelijk belang

Kennis over de interactie tussen voeding en darmgezondheid kan de basis vormen voor de volgende generatie voedingssystemen en andere mogelijkheden tot verbetering van darmgezondheid. Vooralsnog ontbreekt kennis over de interactie tussen de darmmicrobiota en de ontwikkeling en responsiviteit van het immuunsysteem in vleeskuikenkoppels. Verder ontbreekt kennis over hoe een darmmicrobiota samenstelling kan bijdragen aan verbetering van de gezondheid en de productieprestaties van vleeskuikens. Deze kennis zou het voor voedingsbedrijven en wetenschappelijke instellingen mogelijk kunnen maken om interventies te ontwikkelen waarmee de immuun competentie en daarmee de robuustheid van vleeskuikens gunstig beïnvloed kan worden.

Om vervolgprouven te kunnen doen (voor onze eigen dierprouven maar ook voor proefdierinstellingen in het algemeen) is het van belang om te achterhalen of direct en indirect contact tussen vleeskuikens effect heeft op de samenstelling van de darmmicrobiota, en in welke mate. Deze proef zorgt voor meer inzicht in de dynamiek van direct en indirect contact tussen vleeskuikens. Omdat we willen voorkomen dat de uitkomsten van een voerinterventie beïnvloedt worden door het studiedesign in plaats van de interventie is deze fundamentele vraag van belang. Daarnaast is deze vraag van belang als input voor de wiskundige modellen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het project ██████████, zoals omschreven in de achtergrond bestaat uit meerdere onderdelen. De eerste was om een veldstudie uit te voeren voor het ontwikkelen van een methode om darmmicrobiota in vleeskuikenkoppels te karakteriseren en de mate van variatie vast te stellen (aanvraagnummer ADV10800201644). Op dit moment worden deze monsters verzameld en geanalyseerd. Uit ons literatuur onderzoek is gebleken dat direct en indirect contact veel effect kan hebben op de samenstelling van de darmmicrobiota. Daarom willen we vleeskuikens die gehuisvest zijn in grondstallen vergelijken met dieren ██████████. De kuikens zullen 2-3 verschillende voeren ontvangen, zodat er groepen kuikens met verschillende darmmicrobiota samenstelling zullen ontstaan. Dit doen we omdat ██████████ verwachten dat er minder variatie van de microbiota tussen de groepen dieren zal zijn dan tussen de groepen dieren ██████████. De hypothese zoals hierboven al omschreven is dat wanneer dieren in dezelfde ruimte leven er uitwisseling van de microbiota kan plaatsvinden welke effect kan hebben op de interpretatie van voerprouven.

Wij gaan deze proef samen met onze consortiumspartner uitvoeren, waardoor een groot deel van de

dieren niet binnen de universiteit zal worden gehuisvest. Onze consortiumpartner heeft al een vergunning voor het uitvoeren van de proef. Die dieren vallen dan ook niet binnen deze aanvraag.

De eerste fase van deze proef zal parallel aan de proef van onze consortiumpartner plaatsvinden. Bij de consortiumpartner wordt een reguliere voerproef uitgevoerd waarbij de uitleesparameter groei en microbiota samenstelling zijn. Via de consortiumpartner is bekend dat het voer, verschillen in darmmicrobiota samenstelling geeft. We zullen alleen voer gebruiken waarvan bekend is dat dit verschillende microbiota samenstelling geeft. We gaan dezelfde dieren in dezelfde omstandigheden (o.a. zelfde moederdieren, zelfde bezettingsgraad, zelfde voer, zelfde lichtschema's, zelfde strooisel) [REDACTED] en grondstallen van de UU dieren en bij onze consortiumpartner, zodat we kunnen onderzoeken of de standaard opzet van voedingsexperimenten, met hokken in dezelfde ruimte, en onze [REDACTED] en grondstallen geschikt zijn voor het kunnen vaststellen van verschillen in microbiota samenstelling. Mochten we verschillen in samenstelling vinden die de interpretatie van de voerproef veranderen, dan is een volgende fase nodig. In deze tweede fase willen we bestuderen of bijvoorbeeld de [REDACTED] van de grondstallen een positief effect kan hebben op het behouden van de variatie tussen groepen dieren, zodat er beter onafhankelijke waarnemingen in dezelfde ruimte kunnen ontstaan.

De project strategie en het wetenschappelijk belang zijn nauw met elkaar verbonden. Want om vervolgprouwen te kunnen doen is het van belang om te achterhalen of direct en indirect contact effect heeft op de samenstelling van de darmmicrobiota, en in welke mate. Daarom is het van groot belang dat deze proeven uitgevoerd kunnen 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.

Zoals beschreven bij 3.4.1 zullen de type(n) dierproeven voerproeven zijn. Waarbij voor ons niet de hoofdvraag is of het voer een positief effect heeft op de groei van de dieren maar of, en in welke mate, direct en indirect contact effect heeft op de samenstelling van de darmmicrobiota.

In de eerste fase van de proef zal er bestudeerd worden of er tussen hokken in een standaard voerproef setting onderlinge beïnvloeding van de darmmicrobiota samenstelling is. Hierbij worden kuikens gehuisvest [REDACTED] en grondstallen op de UU vergeleken met dieren gehuisvest in grondstallen bij onze consortiumpartner. De dieren gehuisvest bij de consortiumpartner vallen niet onder deze vergunning.

Als er sprake is van onderlinge beïnvloeding van de darmmicrobiota, is de tweede fase nodig om te onderzoeken of dit kan worden tegengegaan. Bijvoorbeeld door het [REDACTED] tussen hokken of door een andere manieren van [REDACTED] te gebruiken. Tijdens deze proeven zullen de kuikens ook gehuisvest worden in grondstallen op de UU.

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

De resultaten van de eerste fase zijn bepalend voor de beslissing om door te gaan naar de tweede fase. Hierdoor kunnen we heel doelgericht te werk gaan en de inzet van dieren en middelen zoveel mogelijk beperken tot wat strikt noodzakelijk is. Wanneer blijkt dat uit de gezamenlijke proef met de consortiumpartner er geen verschillen worden gevonden in de samenstelling van de darmmicrobiota, zullen we niet verder gaan met de tweede fase van deze proef. Maar wanneer dit wel het geval blijkt te zijn, dan is het belangrijk om het effect van huisvesting op de darmmicrobiota samenstelling verder te onderzoeken. Aangezien dit een fundamentele vraag is, zal de vervolgfase binnen UU plaatsvinden.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Effect van direct en indirect contact tussen vleeskuikens op de samenstelling van de darmmicrobiota.
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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Effect van direct en indirect contact tussen vleeskuikens op de samenstelling van de darmmicrobiota.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Er zijn aanwijzingen uit onderzoek dat er onderlinge beïnvloeding is van microbiota binnen en tussen hokken in dezelfde ruimte is (Hildebrand et al., 2012 Genome Biology 14:R4; Schloss et al., 2014 Microbiome. Jul 21;2:25; Ludvigsen et al., 2016, Front Vet Sci. 3:16). Bij experimenten waarbij diervoeders /additieven bij vleeskuikens worden vergeleken, zoals bij onze consortiumpartner in het project, bevinden de verschillende groepen zich in grondhokken naast elkaar in één ruimte. Wanneer er niet alleen uitwisseling van darmbacteriën binnen een hok optreedt, maar ook tussen verschillende proefgroepen, kan dit veel invloed kunnen hebben op conclusies die uit voerproeven getrokken kunnen worden. Voor de opzet van toekomstige voerproeven binnen ons onderzoeksproject is het belangrijk om hier meer inzicht in te krijgen. Dit is de reden waarom we willen onderzoeken hoe de samenstelling van darmmicrobiota in vleeskuikens zich binnen en tussen hokken gedraagt in afgezonderde groepen die elkaar onderling niet kunnen beïnvloeden [REDACTED] en in grondhokken die zich in dezelfde onderzoekstal bevinden (stallen consortiumpartner en stallen in onze eigen onderzoeksfaciliteit bij UU).

Onze hypothese is dat direct en indirect contact tussen vleeskuikens de samenstelling van de microbiota kunnen beïnvloeden. De invloed van het indirecte contact kunnen we tegenaan door dieren [REDACTED] te plaatsen, zodat we kunnen inschatten hoe groot de effecten ervan zijn. Om het effect van direct en indirect contact tussen vleeskuikens op het verloop van de samenstelling van de darmmicrobiota in de tijd in kaart te brengen is het belangrijk dat de groepen onderling verschillen. Daarom worden verschillende typen voer gegeven of wordt een behandeling met een antibioticum gegeven. Van deze typen voer of behandeling is bekend dat het een effect heeft op de samenstelling van de darmmicrobiota, op basis van eerder onderzoek door onze consortiumpartner. Zo kunnen we onderzoeken of de variatie binnen en tussen hokken heel anders is bij kuikens [REDACTED] (waarbij geen indirect beïnvloeding kan plaatsvinden) en kuikens gehuisvest in de grondhokken.

In de eerste fase (met onderzoeksvraag 1: Is er tussen hokken in een standaard voerproef setting onderlinge beïnvloeding van de darmmicrobiota samenstelling: Experiment 1) zullen vleeskuikens van dezelfde herkomst gehuisvest in grondhokken bij onze consortiumpartner vergeleken worden met grondhokken en ██████ binnen de UU. Bij onze consortiumpartner wordt een voerproef uitgevoerd en in dergelijke studies worden gewichten en voederconversie als uitleesparameter gebruikt omdat dit iets zegt over hoe goed de darmbacteriën functioneren bij de vertering van het voer. Binnen de UU zijn wij vooral geïnteresseerd in welke darmbacteriën nu aanwezig zijn. Daarnaast willen we ook de gewichten en voeropname van de kuikens die binnen de UU worden gehuisvest weten, om vast te stellen of de dieren in beide omgevingen volgens de Ross-norm presteren. Dezelfde opzet wordt nog eenmaal herhaald voor alleen het deel van het experiment binnen UU (grondhokken ██████) om vast te stellen of eventueel gevonden verschillen herhaalbaar zijn.

De belangrijkste uitleesparameter voor deze dierproef is de samenstelling van bacteriën in blinde darm (caecale) mestmonsters, verzameld bij postmortaal onderzoek. Deze wordt bepaald door middel van 16s rRNA sequencing en geanalyseerd met bioinformatica software. Hieruit wordt de alfa- & beta- diversiteit bepaald, wat veel gebruikte maten in het microbiomonderzoek zijn om de mate van diversiteit in de samenstelling van darmmicrobiota te kunnen vaststellen (Lozupone and Knight 2008, FEMS Microbiol Rev 32, 557-578). (*Alfa diversiteit is een maat voor het soortenaantal van een de darm, dit gaat over welke bacteriën er leven (within sample). Beta diversiteit is een maat voor de verscheidenheid aan bacteriën in de darm tussen, in ons geval dieren, dit gaat over hoe verschillend is de samenstelling van darmbacteriën tussen dieren (between samples).*) Wanneer we in experiment 1 dusdanige verschillen in darmmicrobiota samenstelling vinden die de interpretatie van de voerproef mogelijk veranderen, op basis van deze alfa- & beta- diversiteit, dan is een volgende onderzoeksfase nodig.

Voor de tweede fase willen we onderzoeken of en hoe de onderlinge beïnvloeding tussen hokken kan worden tegengegaan. We willen in experiment 2 bestuderen of de ██████ van de grondhokken een positief effect kan hebben op het behouden van de variatie tussen groepen dieren, zodat er meer onafhankelijke waarnemingen in dezelfde ruimte kunnen ontstaan. Daarnaast willen we in dit experiment onderzoeken of door middel van verschillende ██████, bijvoorbeeld ██████ extra ██████ als ██████ etc. de onderlinge beïnvloeding op de darmmicrobiota samenstelling kan worden tegen gegaan.

Voor experiment 2 willen we gebruik maken van de onderzoekstallen bij de UU, waarbij in één stal, maximaal 10 hokken met twee voerinterventies waarbij wel of geen ██████, wel of geen ██████ tussen de hokken zal worden geplaatst. In totaal zullen voor experiment 2 maximaal 4 stallen worden gebruikt zodat er steeds een herhaling van elke stal (wel of geen ██████ wel of geen ██████) is. Ook hier zal de alfa- & beta-diversiteit worden gemeten om verschil in de samenstelling van de microbiota te kunnen weergeven.

Daarnaast zullen we in deze experimenten monsters voor het bepalen van de microbiota samenstelling op verschillende manieren verzamelen. Er worden cloacaswabs genomen op verschillende momenten (om veranderingen in de tijd te kunnen volgen) en caecale darminhoud (bij postmortaal onderzoek op maximaal 4 momenten gedurende de productieperiode) om onderling te kunnen vergelijken. Wanneer blijkt dat de swabs voldoende representatief zijn zal in toekomstige proeven deze minder invasieve methode van monsternamen toegepast kunnen worden.

De volgende uitkomstparameters gelden voor alle 2 experimenten binnen deze dierproef

Primaire uitkomstparameters:

- Samenstelling microbiota (binnen hok en tussen hok), op basis van caecale darminhoud.
- Prestaties (groei, voederconversie), dit zal vooral voor de dieren die bij onze consortium partner gehuisvest zijn de uitkomstparameter zijn (met name dus van toepassing in experiment 1, maar tevens gemeten in experiment 2).

Secondaire uitkomst parameters:

- Cloaca swabs (vergelijkbaarheid met caecale microbiota samenstelling)

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.

Vleeskuikens in een commerciële setting worden vanaf dag van uitkomst (dag 0) tot 35-42 dagen leeftijd gehouden (duur productieronde gemiddeld 6 weken), vandaar dat wij dit ook willen. De dieren zullen

verschillend voer krijgen of een aan voer toegevoegd antibioticum waarvan bekend is dat dit grote effecten kan hebben op de darmmicrobiota samenstelling. Voor de exacte keuze van het voer zullen we gebruik maken van de expertise van onze consortium partners (een voerproducent) en Wageningen Universiteit.

Op dag 0 komen de kuikens voor plaatsing bij onze partner (alleen voor experiment 1) en bij UU uit dezelfde broedmachine (bij onze partner of in onze faciliteit) of van dezelfde commerciële broederij en zullen de dieren random verdeeld worden tussen grondhokken [REDACTED]. Het betrekken van de vleeskuikens van dezelfde plek voor de verschillende onderzoek locaties is belangrijk omdat ook de herkomst van vleeskuikens veel invloed kan hebben op darmmicrobiota samenstelling.

Op verschillende tijdstippen worden de kippen gewogen en zullen er cloacaswabs worden genomen (maximaal 10x in 6 weken). Swabben is geen invasieve handeling, maar het beetpakken en swabben zal wel voor licht ongerief als gevolg van kortdurende onrust zorgen. Gedurende de proef worden op enkele momenten bloedmonsters genomen, o.a. voor onderzoek naar cytokines [REDACTED].

[REDACTED] Dit betekent dat er bijvoorbeeld een interferon a/b assay gedaan kan worden, waarbij de hoeveelheid interferons (a/b) kan worden gemeten. Deze cytokines worden geproduceerd na contact met pathogenen en kunnen onder andere naturalkillercellen cellen activeren. Deze bepaling zal niet door de onderzoekers van de aanvraag zelf worden uitgevoerd. Het uitvoeren van de metingen zal wel eerste inzicht geven in of de samenstelling van de microbiota effect heeft op deze immunologische uitleesparameter.

Daarnaast willen wij deze handelingen uitvoeren zodat de dieren [REDACTED]. [REDACTED] Daarnaast worden kuikens op dag 0, halverwege en aan het einde van de productieronde doodgemaakt door cervicale dislocatie (bij dieren onder 250 gram) of elektrocutie gevolgd door verbloeding. Hierbij zullen de organen, bloed, darminhoud en darmweefsel worden gebruikt om de gezondheid van de dieren te bestuderen en om de samenstelling van de darmmicrobiota te bepalen.

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

In de literatuur zijn weinig microbiota studie die herhalingen bevatten, dit heeft te maken met de van oorsprong vrij hoge kosten voor het sequencen van het materiaal. Maar gezien de kosten de afgelopen jaren erg gedaald zijn willen wij wel herhalingen uitvoeren tussen experimenten om de herhaalbaarheid van ons experiment te onderzoeken.

Onze consortiumpartner zal reguliere voerproeven uitvoeren waarbij om een statisch significant effect te kunnen vinden op basis van performance (groei, voederconversie) 15-20 dieren per hok van 2m² worden gehuisvest. Daarom zullen wij de bezettingsgraad van onze consortiumpartner volgen zodat onze resultaten voor de microbiota samenstelling vergelijkbaar zijn. Het is namelijk bekend dat dichtheid de samenstelling kan beïnvloeden (Guardia et al, 2011 Poultry Science 90 :1878-1889). Daarom zullen er maximaal 10 dieren [REDACTED] en grondhok (1m²) binnen de UU worden gehuisvest om dezelfde bezettingsgraad te hanteren.

Op basis van een PERMANOVA berekeningen (Kelly et al., 2015 Bioinformatics btw183) hebben we een schatting gemaakt waaruit kwam dat we ongeveer 40 dieren per voergroep nodig hebben om een verschil te kunnen vinden tussen de variatie van microbiota. De mate van variatie zullen we o.a. beoordelen door gebruik te maken van een principal component analysis (PCA).

We zullen maximaal van [REDACTED] gebruik maken zodat we [REDACTED] per voer interventie zullen hebben en omdat we dezelfde dichtheid als onze consortiumpartner gebruiken gaan we niet meer dan 10 dieren [REDACTED] huisvesten. Dit geeft in totaal maximaal 50 dieren per voer groep. Voor onze statistische analyse zouden we kunnen volstaan met 40 dieren per voer groep (dus n=8 [REDACTED] maar omdat de consortiumpartner een hogere dichtheid gebruikt en de vergelijking met hun onderzoekstallen erg belangrijk is, willen wij dezelfde dichtheid gebruiken en dus iets meer dieren opzetten. Om onze studie design zo veel mogelijk in balans (statistisch) te brengen, gebruiken we dezelfde opzet [REDACTED] voor de grondhokken.

Om in de volgende fase van het onderzoek hopelijk minder dieren nodig te hebben, willen we onderzoeken of door gebruik te maken van cloaca swabs, dieren longitudinaal kunnen worden gevolgd zonder te doden.

B. De dieren

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

De keuze voor de tijdstippen waarop de kuikens tussentijds gedood zullen worden, zal worden bepaald naar aanleiding van de resultaten uit de veldstudie (aanvraagnummer ADV10800201644). Maar dit zal gezien het beperkte aantal kuikens waarmee we onze proeven opzetten niet meer dan 2x tussentijds gebeuren.

De broedeieren of de kuikens die we zullen gebruiken zijn afkomstig van een commerciële boerderij. Wanneer we eieren gaan uitbroeden zal een uitkomstpercentage van 80% zal worden aangehouden voor het bestellen van eieren. Mochten er nu toch meer dieren uitkomen, dan zullen deze volgens de richtlijn worden geëuthanaseerd. Omdat we zo dicht mogelijk bij de situatie in de praktijk willen blijven gebruiken we geen SPF dieren maar het meest gebruikte vleeskuikenmerk, Ross 308. Er is voor vleeskuikens gekozen omdat in dit project wordt gestreefd naar een verbetering van de huidige weerstand in vleeskuikens (doeldier).

Op basis van wat in A is beschreven schatten we in dat maximaal 2 herhalingen van het experiment nodig zijn voor de eerste fase. Wanneer blijkt dat we in de eerste fase in een standaard voerproef setting onderlinge beïnvloeding van de microbiota samenstelling vinden willen we een vervolg experiment uitvoeren. Het doel van het vervolg experiment is om te onderzoeken of we de onderlinge beïnvloeding van de microbiota samenstelling kunnen tegengaan. In productieronde 2 willen we 2 aparte onderzoekstallen ipv 1 stal gebruiken omdat deze herhaling zeer waarschijnlijk niet parallel uitgevoerd kan worden met onze consortiumspartner. Deze herhaling en de extra onderzoekstal zijn nodig omdat we uit eerder onderzoek weten dat de kwaliteit van de kuikens erg verschillend kan zijn, bijvoorbeeld veroorzaakt door de variatie in de leeftijd van de moederdieren. We willen voorkomen dat verschillende kuikens zorgen voor een ander uitkomst van de proef.

Fase 1

Onderzoeksvraag 1: Is er tussen hokken in een standaard voerproef setting onderlinge beïnvloeding van de darmmicrobiota samenstelling?

Overzicht geschatte aantal dieren:

Productieronde 1: maximaal 40 kuikens dag 0 (start meting) + 10 kuikens [REDACTED], is 100 kuikens + 10 kuikens per grondhok, 10 hokken, 1 stal, is 100 kuikens (maximaal 240 kuikens). Daarnaast zullen een vergelijkbaar aantal kuikens van onze consortiumspartner worden gebruikt voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag, deze dieren vallen buiten deze aanvraag.

Productieronde 2: maximaal 40 kuikens dag 0 (start meting) + 10 kuikens [REDACTED], is 100 kuikens + 10 kuikens per grondhok, 10 hokken, 2 stallen, is 200 kuikens (maximaal 340 kuikens).

Als uit de eerste fase blijkt dat er variatie (indirecte transmissie) in microbiota samenstelling tussen de locaties blijkt te zijn zullen we in de 2^{de} fase onderzoeken welke interventies dit zouden kunnen voorkomen. In de 2^{de} fase (productieronde 3 & 4) zullen 4 onderzoekstallen worden gebruikt omdat we van elke interventie een herhaling van de stal willen, zodat we niet een stal effect meten. De interventies zullen bestaan uit een interventie zoals beschreven in A, bijvoorbeeld [REDACTED] van de grondhokken [REDACTED] en kijken of dit een positief effect kan hebben op het behouden van de variatie tussen groepen dieren, zodat er meer onafhankelijke waarnemingen in dezelfde ruimte kunnen ontstaan. Daarnaast willen we in dit experiment onderzoeken of door middel van verschillende [REDACTED], bijvoorbeeld [REDACTED] [REDACTED], extra [REDACTED] etc. de onderlinge beïnvloeding op de darmmicrobiota samenstelling kan worden tegengegaan.

Fase 2

Onderzoeksvragen

Onderzoeksvraag 2: Als er sprake is van onderlinge beïnvloeding, kan dit worden tegengegaan door het [REDACTED]

Onderzoeksvraag 3: Als er sprake is van onderlinge beïnvloeding, kan dit door andere manieren van [REDACTED] worden tegengegaan?

Overzicht geschatte aantal dieren:

Productieronde 3: maximaal 40 kuikens dag 0 (start meting) + 10 kuikens per grondhok, 10 hokken, 4 stallen, is 400 kuikens (maximaal 440 kuikens).

Productieronde 4: maximaal 40 kuikens dag 0 (start meting) + 10 kuikens per grondhok, 10 hokken, 4 stallen, is 400 kuikens (maximaal 440 kuikens).

Om rekening te houden met uitval (op reguliere bedrijven bedraagt deze gemiddeld 3,5-4% in 42 dg) en om selectie van kuikens op basis van diergewicht mogelijk te maken in het begin van het experiment, willen we 10% extra dieren inzetten. Hiermee komen we uit op $1460 + 10\% = 1606$ dieren maximaal. Wanneer ten tijde van het uitvoeren van de dierproef getallen beschikbaar zijn van recentere studies op basis waarvan

betere schattingen gedaan kunnen worden kunnen deze aantallen nog veranderen.

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 variatie in samenstelling van de darmmicrobiota binnen en tussen hokken is het gevolg van een dynamisch proces waarbij uitscheiding van bacteriën in de omgeving, overleving van de bacteriën in de omgeving en verspreiding [REDACTED] een rol spelen. Deze processen zijn voornamelijk anders te bestuderen dan in groepen levende dieren.

Vermindering:

- Tijdens de eerste productie ronde en eerste fase van de proef mogen we gebruik maken van de dieren die gehuisvest zijn bij onze consortiumspartner (eigen CCD vergunning). Deze dieren worden tevens gebruikt voor een andere onderzoeksvraag van onze partner. We starten de proef gelijktijdig en besparen op deze manier dieren en vergroten de power van onze resultaten.
- De keuzes van de voertypes/antibioticum behandeling worden gebaseerd op eerder onderzoek van onze consortiumspartner: hierdoor weten we op voorhand dat de groepen zullen verschillen in microbiota samenstelling. Hierdoor kan goed worden vastgesteld of deze verschillende groepen elkaar beïnvloeden.
- De uitkomsten zullen in wiskundige modellen gebruikt worden die mede kunnen helpen voorspellen hoe deze processen tussen dieren in grote pluimveestallen plaatsvinden.
- Wanneer uit de eerste fase blijkt dat er geen verschillen zijn tussen hokken dan hoeven we niet de tweede fase van deze proeven uitvoeren.

Verfijning:

- Het onderzoeken van cloacaswabs als mogelijke monsternamemethoden kan hopelijk in de toekomst zorgen voor het leveren van longitudinale data wat zal bijdragen aan het beter kunnen bestuderen van de ontwikkeling van de microbiota van het individuele dier.
- Het vleeskuiken is het doeldier binnen dit project, waardoor de uitkomsten makkelijk vertaalbaar zijn naar de uiteindelijke toepassing in de praktijk.
- Er is veel ervaring in de onderzoeksgroep en bij de dierproeffaciliteit met vergelijkbare proeven: hierdoor is het diermanagement en de gezondheidsmonitoring van de vleeskuikens goed gewaarborgd en zal tijdig worden ingegrepen bij welzijnsaantastingen.

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 groepen gehouden in een rustige omgeving die aansluit bij hun behoeften wat betreft management van klimaat, licht, strooisel en voer en watervoorziening. De dieren worden het gehele experiment op strooisel gehouden, [REDACTED]. Daarnaast wordt het welzijn en de gezondheid van de dieren elke dag gecontroleerd. Hierdoor worden eventuele welzijnsaantastingen snel gesignaleerd en kan snel worden ingegrepen door aanpassingen in het management, een passende behandeling of euthanasie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Niet van toepassing.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

We willen de dieren houden in een bezettingsgraad die de praktijksituatie zoveel mogelijk benadert en dezelfde bezettingsgraad als onze consortiumpartner gebruiken. Onze consortiumpartner zal 15-20 dieren per 2m² huisvesten, daarom zullen er maximaal 10 dieren [REDACTED] worden gevolgd. Wanneer de bezettingsgraad wordt omgerekend naar aantal kg/m² komen we met 10 kuikens van maximaal 42 dagen uit op circa 30kg per m². Dit is ver onder de normen van de EU welzijnsrichtlijn 2007/43/EG, waarbij veelal een bezettingsgraad van 39 kg/m² wordt gebruikt in commerciële stallen.

We verwachten geen negatieve effecten op het welzijn van de dieren als gevolg van deze afwijking van het geadviseerde oppervlak volgens de richtlijn 2010/63/EU. De bezettingsgraad is ver onder commerciële normen en daarnaast zijn bij proeven van collega's [REDACTED] vaak veel grotere dieraantallen [REDACTED] gehouden, zonder dat dit tot grote welzijnsproblemen heeft geleid. Daarnaast geldt dat de dieren, [REDACTED] wel beschikking krijgen over een vloer met strooisel. Daarnaast zijn klimaatomstandigheden [REDACTED] goed te reguleren bij deze kleine aantallen dieren en worden ze goed in de gaten gehouden zodat kan worden ingegrepen wanneer er negatieve effecten zouden zijn op gezondheid en welzijn. Verder is de huisvesting en verzorging conform de richtlijn 2010/63/EU.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen welzijnsaantastingen voorzien die gerelateerd zijn aan het experiment zelf. Eventuele pootproblemen of metabole stoornissen kunnen optreden als gevolg van genetische aanleg voor snelle groei.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Eventuele pootproblemen of metabole stoornissen die in sommige gevallen optreden zijn het gevolg van de genetische aanleg voor snelle groei.

Wanneer het strooisel nat wordt door te vochtige mest, of bijvoorbeeld door slechte ventilatie of lekkage van drinkwatervoorzieningen, kunnen tevens voetzoollaesies of andere huidirritaties ontstaan.

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

We verwachten dat welzijnsproblemen die onder praktijkomstandigheden voorkomen [REDACTED] zeer beperkt zullen blijven. Klimaatomstandigheden zijn goed te reguleren en deze omstandigheden en koppelgezondheid worden zeer intensief gemonitord. Bij dreigende voetzoolproblemen door teveel contact met nat strooisel wordt dit verwijderd / bij gestrooid en zal extra aandacht gegeven worden aan het regelmatig beoordelen van de locomotie. Als de dieren te snel lijken te gaan groeien / teveel voer opnemen kan worden ingegrepen door aanpassingen in het lichtschema.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Wanneer wordt waargenomen dat:

- een dier niet in staat is zelfstandig het voer en/of drinkwater tot zich te nemen;
 - een dier ernstig ziek is, ernstig verwond is of ernstige pijn vertoont;
- wordt overgegaan tot euthanasie.

Hierbij wordt als algemeen criterium het "analogieprincipe" gehanteerd, wat inhoudt dat men ervan uitgaat dat handelingen of toestanden die bij de mens als pijnlijk worden ervaren ook door dieren als pijnlijk zullen worden ervaren. Voor kippen geldt dat zij niet snel ziekte, pijn of verwondingen zullen laten zien. Wanneer wel verschijnselen getoond worden, moet dit als serieus tot ernstig geïnterpreteerd worden en worden de dieren nader bekeken. Gewichtsverlies is bij vleeskuikens niet zo'n bruikbare parameter omdat vanwege hun hoge groeisnelheid er al sprake kan zijn van ongerief als de dieren achterblijven in groei. Wanneer dieren achter lijken te blijven in gewicht worden deze dieren extra geobserveerd en wordt de kropvulling met regelmatige tussenpozen beoordeeld. Wanneer er niet of nauwelijks voer wordt opgenomen gedurende 2 opeenvolgende dagen en dit niet verbetert, wordt overgegaan tot euthanasie.

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

< 3.5-4%

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.

Swabben: licht ongerief (het swabben zelf veroorzaakt nauwelijks ongerief maar in combinatie met het vangen en hanteren maximaal licht ongerief)

Doodmaken: licht ongerief

Bloedprikken: licht ongerief

Bij de bloedafname wordt gezorgd voor een goede fixatie van het dier en neemt een ervaren persoon de monsters af waardoor de kans op ontstaan van een hematoom klein is. Toch kan bij het aanprikken van de vleugelvene in sommige gevallen een hematoom ontstaan. Ook kunnen enkele dieren nog even nabloeden na afloop van de bloedafname. Een hematoom kan ontstaan als de naald niet voldoende op 1 plek (in het vat) blijft tijdens de bloedafname, wanneer teveel vacuüm op de spuit wordt gehouden of wanneer de huid rondom het vat wordt verplaatst met de hand of door het bewegen van het bloedbuisje tegen de huid bij het vat.

Cumulatief: 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.

Voor het onderzoek is de caecale mestmonsters uit de darmen nodig. Het is niet mogelijk om dit uit de levende dieren te halen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1080020171005

Bijlagen

2

Datum 16 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 maart 2017. Het gaat om uw project "Dynamiek van darmmicrobiota binnen en tussen hokken met vleeskuikens en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1080020171005. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

16 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020171005

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
16 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171005

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: Universitair Docent
Afdeling: Fac. Diergeneeskunde, Dpt. Landbouwhuisdieren
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Datum:
16 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171005

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Promovendus
Afdeling: Fac. Diergeneeskunde, Dpt. Landbouwhuisdieren
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 juni 2017
Geplande einddatum: 1 juni 2020
Titel project: Dynamiek van darmmicrobiota binnen en tussen hokken met vleeskuikens en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven.
Titel niet-technische samenvatting: Onderlinge beïnvloeding van de darmflora bij vleeskuikens binnen en tussen hokken en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven.
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
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: 14 maart 2017

Datum:
16 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171005



> 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
AVD1080020171005
Bijlagen
2

Datum 16 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 maart 2017
Vervaldatum: 15 april 2017
Factuurnummer: 171005
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1080020171005	€ 935,00

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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.II.803.001
2. Titel van het project : Dynamiek van darmmicrobiota binnen en tussen hokken met vleeskuikens en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven
3. Titel van de NTS : Onderlinge beïnvloeding van de darmflora bij vleeskuikens binnen en tussen hokken en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven

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: 03-02-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 15-02-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 20-02-2017/21-02-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 13-03-2017

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: 20-02-2017
- Datum antwoord: 21-02-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.2 Doel: In de derde alinea zegt u dat u ook verschillende monsternamemethoden wilt vergelijken. Dit komt echter niet terug in de daaronder geformuleerde onderzoeksvragen. De DEC raadt u aan dat alsnog op te nemen als tweede subdoel.

Een tweede subdoel is om verschillende monsternamemethoden uit te voeren opdat de uitkomsten ook inzicht kunnen geven over typen monsters die in toekomstige proeven genomen moeten worden. Onderzoeksvraag 4: Hoe vergelijkbaar zijn de microbiota van individuele dieren verkregen door het cloaca swabben met de microbiota verkregen door de darminhoud te bemonsteren?

- 3.2 Doel: Een verwachte opbrengst die niet vermeld wordt is: dat door de microbiota in de verschillende groepen te bestuderen men in de toekomst veel beter de effecten van hygiënemaatregelen in de dierhouderij kan kwalificeren en kwantificeren. De DEC raadt u aan dit alsnog op te nemen.

Hygiënemaatregelen zijn inderdaad erg interessant om verder te onderzoeken, maar om de effecten van hygiënemaatregelen in de dierhouderij te kunnen kwalificeren en kwantificeren zal meer onderzoek nodig zijn dan deze studie. Het is namelijk zo dat het meten van de microbiota geen inzicht geeft in de bacteriële load die aanwezig is. Wij gaan gebruik maken van 16s rRNA gen amplificatie (Illumina sequencing) en dit geeft ons alleen inzicht in welke, en welk percentage, bacteriën aanwezig zijn in een monster. Onze interventie om mogelijk indirecte transmissie van microben tegen te gaan zal eerder een indicatie geven voor de noodzaak van vervolgonderzoek. Een heel concreet antwoord over hoe in de toekomst veel beter de effecten van hygiënemaatregelen in de dierhouderij kunnen worden gekwalificeerd en gekwantificeerd verwachten wij niet te vinden. Wanneer echter blijkt dat er inderdaad indirecte transmissie tussen hokken optreedt is dit vooral belangrijk voor proefdierfaciliteiten om rekening mee te houden. Immers, ook in proeven die niet primair op de microbiota samenstelling gericht zijn kunnen diergroepen mogelijk verschillend ergens op reageren en kan dit een proef verstoren. Naar de dierhouderij is de vertaalslag wat lastiger. Het is wel interessant om te kunnen inschatten of bepaalde ziekteverwekkers op deze manier eenvoudig kunnen verspreiden, maar daar is gericht onderzoek naar die ziekteverwekker wellicht meer voor van toepassing. Bovendien zitten in de vleeskuikenhouderij alle dieren in grote stallen en is er geen sprake van kleine subgroepen. Echter, voor andere sectoren, zoals de varkenshouderij waarbij wel meerdere hokken in eenzelfde ruimte aanwezig zijn, kan inzicht in deze eventuele transmissie mogelijk wel een aanleiding zijn voor de sector om na te denken over voor- en nadelen van deze uitwisseling van bacteriën en eventuele interventies.

Toegevoegd: Om vervolgonderzoek te kunnen doen (voor onze eigen dierproeven maar ook voor proefdierinstellingen in het algemeen) is het van belang om te achterhalen of direct en indirect contact tussen vleeskuikens effect heeft op de samenstelling van de darmmicrobiota, en in welke mate.

- 3.3 Belang: U zegt: "... voor iedere 1.67 kilo vlees is maar 1 kilo voer nodig". De DEC vraagt zich af of deze ratio klopt of dat de getallen andersom moeten staan. Graag verhelderen. *Het klopt dat de ratio verkeerd om staat, mijn excuus. Deze is aangepast naar: voor iedere kilo vlees is maar 1.67 kilo voer nodig.*

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: In de aanvraag staat: "*Hieruit wordt de alfa- & beta- diversiteit bepaald ...*" Uit interesse vraagt de DEC zich af wat de alfa- & beta- diversiteit precies is. Graag toelichten.
Toegevoegd: (Alfa diversiteit is een maat voor het soortenaantal van een de darm, dit gaat over welke bacteriën er leven (within sample). Beta diversiteit is een maat voor de verscheidenheid aan bacteriën in de darm tussen, in ons geval dieren, dit gaat over hoe verschillend is de samenstelling van darmbacteriën tussen dieren (between samples)).
- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De zin: "Gedurende de proef worden op enkele momenten bloedmonsters genomen, o.a. voor onderzoek naar immuuncellen [REDACTED] roept vragen op omdat u ineens spreekt over immuuncellen. De DEC verzoekt u de bloedafname nader uit te leggen en te rechtvaardigen.
Aangepast: Gedurende de proef worden op enkele momenten bloedmonsters genomen, o.a. voor onderzoek naar cytokines [REDACTED]
Toegevoegd: Dit betekent dat er bijvoorbeeld een interferon a/b assay gedaan kan worden, waarbij de hoeveelheid interferons (a/b) kan worden gemeten. Deze cytokines worden geproduceerd na contact met pathogenen en kunnen onder andere naturalkillercellen cellen activeren. Deze bepaling zal niet door de onderzoekers van de aanvraag zelf worden uitgevoerd. Het uitvoeren van de metingen zal wel eerste inzicht geven in of de samenstelling van de microbiota effect heeft op deze immunologische uitleesparameter. Daarnaast willen wij deze handelingen uitvoeren zodat de dieren op [REDACTED]

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Ook hier kan nog vermeld worden dat door de effecten van hygiënemaatregelen op de samenstelling van de darmflora te bestuderen dit in de toekomst beter gekwalificeerd en gekwantificeerd kan worden.
Zie eerdere respons. Voor de NTS lijkt het ons niet direct van toepassing om hier een verwijzing over op te nemen omdat de vertaalslag naar de veehouderij niet zo eenvoudig zal zijn. Wel hebben we toegevoegd dat dit niet alleen belangrijke informatie is voor onze eigen dierproeven maar ook voor proefdierinstellingen in het algemeen.
Toegevoegd: Voor de opzet van toekomstige voerproeven binnen ons onderzoeksproject en proefdierinstellingen in het algemeen is het belangrijk om hier meer inzicht in te krijgen.
- 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 is bekend dat de samenstelling van het darmmicrobioom van vleeskuiken binnen en tussen koppels varieert, en dat deze beïnvloed wordt door verschillende diergerelateerde en omgevingsfactoren. De samenstelling van het darmmicrobioom op zijn beurt heeft grote invloed op allerlei fysiologische processen, waaronder de ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem. Binnen de pluimveehouderij is behoefte aan diepgaandere kennis op dit gebied, omdat een optimale ontwikkeling van (het aangeboren immuunsysteem van) vleeskuikens bijdraagt aan optimaal presterende koppels vleeskuikens in termen van gezondheid, welzijn en efficiënte groei. Wanneer bekend is hoe de ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem in vleeskuikens verloopt (onderwerp van een projectaanvraag waarvoor de CCD recentelijk een vergunning heeft verleend), en hoe deze door de samenstelling van het darmmicrobioom beïnvloed wordt (onderwerp van een andere projectaanvraag), dan kan men mogelijk in de toekomst met behulp van voederinterventies een optimale ontwikkeling van vleeskuikens ondersteunen. Om betrouwbare uitspraken te kunnen doen over de effectiviteit van dergelijke voederinterventies is het van belang dat de opzet van de voerexperimenten gevalideerd wordt. Het is namelijk mogelijk dat indirecte transmissie van darmbacteriën tussen experimentele groepen/hokken een vertekend beeld geeft van de effecten van voederinterventies. De validatie en eventuele optimalisatie van de opzet van voerexperimenten met vleeskuikens is onderwerp van de voorliggende projectaanvraag.
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 doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het in kaart brengen van de dynamiek van de darmmicrobiota van vleeskuikens, zodat de opzet van toekomstige voerexperimenten geoptimaliseerd kan worden. Dit onderzoeksproject maakt deel uit van een NWO-project, dat opgezet is om [REDACTED] te ontwikkelen, die de [REDACTED] van het [REDACTED] zodanig kunnen beïnvloeden, dat het [REDACTED] van vleeskuikens [REDACTED] tot [REDACTED] komt. Voordat de werkzaamheid van dergelijke voederinterventies onderzocht kan worden is het noodzakelijk om te weten of met de huidige opzet van voedingsexperimenten sprake is van transmissie van darmbacteriën binnen en tussen hokken, en op welke wijze eventuele transmissie voorkomen kan worden. Alleen dan is het mogelijk om de effecten van voederinterventies op de samenstelling van het darmmicrobioom zuiver in beeld te brengen. 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 en het onderzoeksveld, en op de lange termijn de doelgroep (de pluimveehouderij) en de diervoederindustrie. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de doelgroep worden bevorderd zijn: welzijn en rechtvaardigheid (beschikbaarheid van effectieve voederinterventies). De morele waarden die voor het onderzoeksveld en de diervoederindustrie worden bevorderd zijn: welzijn (wetenschappelijke en commerciële ontwikkelingen).
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

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. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met vergelijkbare experimenten in kippen. Alle andere benodigde expertise (m.b.t. de analyse van de samenstelling van het darmmicrobioom, de statistiek en de wiskundige modellen) wordt gewaarborgd door nauwe samenwerking met andere partijen. De DEC is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente inzichten en dat het geen belangrijke hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten beperken. Gezien het feit dat dit projectvoorstel onderdeel is van een groter NWO-project zou het haalbaar moeten zijn dat de resultaten van dit project op termijn leiden tot de ontwikkeling van eerdergenoemde voederinterventies voor vleeskuikens.
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 de eerste fase van het onderzoek wordt een regulier voerexperiment uitgevoerd met voederinterventies waarvan bekend is dat zij een verandering in de samenstelling van het darmmicrobioom van vleeskuikens kunnen bewerkstelligen. Dit experiment wordt met twee verschillende huisvestingsvormen uitgevoerd: experimentele groepen gehuisvest in verschillende hokken binnen dezelfde ruimte (standaardopzet) versus experimentele groepen gehuisvest in verschillende hokken en verschillende ruimten (experimentele opzet met [REDACTED]). Alle andere belangrijke variabelen, zoals moederdieren, lichtschema's en strooisel, zijn identiek voor alle hokken. Wanneer uit deze proef blijkt dat bij de standaardopzet transmissie van darmbacteriën plaatsvindt tussen dieren en hokken, dan wordt in de tweede fase van het onderzoeksproject onderzocht of het mogelijk is om de onderlinge beïnvloeding van de samenstelling van de darmmicrobiota tussen hokken tegen te gaan (met aanpassingen in de [REDACTED], de [REDACTED] en [REDACTED]).

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 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)
10. De dieren worden niet gehuisvest volgens de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn, maar wel verzorgd op een wijze die voldoet aan die eisen. Om de praktijksituatie zo goed mogelijk te benaderen worden dieren in gemengde groepen gehuisvest met een bezettingsgraad die hoger is dan volgens richtlijn 2010/63/EU is toegestaan, maar in geen geval boven de normen van de EU welzijnsrichtlijn 2007/53/EG (voor dieren gehouden voor de productie van vlees) uitkomt. Zowel de dieren als de omstandigheden in de stallen worden intensief gemonitord, zodat tijdig ingegrepen kan worden bij eventuele onverwachte negatieve effecten op gezondheid en welzijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Alle dieren in bijlage 1 worden herhaaldelijke gewogen en bemonsterd met behulp van cloacaswabs. Ook worden op verschillende momenten bloedmonsters genomen. Voor alle dieren wordt het ongerief als gevolg van deze handeling ingeschat als licht.

12. De integriteit van de dieren wordt in gedragsmatig en fysiek opzicht aangetast. Door het [REDACTED] wordt een deel van de dieren de mogelijkheid ontnomen om bepaalde aspecten van hun natuurlijk gedrag uit te oefenen (gedragsmatige aantasting). Daarnaast wordt de integriteit van de dieren fysiek aangetast vanwege de monsternamen en de euthanasie die in het kader van het experiment uitgevoerd worden.
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 maximaal 4% van de dieren voortijd geëuthanaseerd moet worden in verband met reguliere – niet aan het experiment gerelateerde – gezondheidsproblemen (pootproblemen en metabole stoornissen die kunnen optreden als gevolg van genetische aanleg voor snelle groei).

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De kolonisatie en transmissie van bacteriën is afhankelijk van verschillende (deels nog onbekende) diergerelateerde en omgevingsfactoren. De variatie in de samenstelling van de darmmicrobiota tussen dieren en hokken – en de invloed van interventies hierop – kan vooralsnog niet anders dan met *in vivo* experimenten in kaart gebracht 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. De benodigde groepsgrootte is gebaseerd op powerberekeningen en op de bezettingsgraad die bij de consortiumspartner voor vergelijkbare experimenten gehanteerd wordt. Mogelijk kan het voorliggende onderzoeksproject bijdragen aan vermindering van toekomstig proefdiergebruik. Wanneer namelijk uit de vergelijking van de verschillende monsternamemethoden blijkt, dat cloacaswabs eenzelfde beeld geven van de samenstelling van de darmmicrobiota als de caecale monsters die na euthanasie beschikbaar komen, dan is het in toekomstige proeven niet langer noodzakelijk om dieren op verschillende tijdstippen te euthanaseren voor monsternamen, doordat men de samenstelling van het darmmicrobioom met behulp van cloacaswabs longitudinaal in een dier kan vervolgen.
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. De onderzoeksgroep en de proefdierfaciliteit hebben veel ervaring met vergelijkbare proeven. De dieren worden gehuisvest in een rustige omgeving die aansluit bij hun behoeften met betrekking tot klimaat, licht, strooisel, voer en watervoorziening.
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 in het kader van het project gedood, omdat de doelstellingen van het project alleen behaald kunnen worden met behulp van caecale mestmonsters die pas na euthanasie verzameld kunnen worden. De dieren worden volgens een passende en in bijlage IV van de EU richtlijn genoemde methode gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

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 belang van het voorliggende project, dat tot doel heeft de dynamiek van de darmmicrobiota van vleeskuikens in kaart te brengen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren?
2. In het voorliggende project wordt het welzijn en de integriteit van vleeskuikens aangetast, wat gepaard gaat met licht ongerief. Daar staat tegenover dat van dit project verwacht mag worden dat de resultaten bijdragen aan de optimalisatie van toekomstige voerexperimenten, en dat de resultaten belangrijke input vormen worden voor wiskundige modellen met betrekking tot de dynamiek van de darmmicrobiota van vleeskuikens. Op de langere termijn kan het voorliggende project ook van belang zijn voor de pluimveehouderij, omdat met behulp van deze kennis mogelijk voederinterventies ontwikkeld kunnen worden die een optimale ontwikkeling van vleeskuikenkoppels ondersteunen. Niet alleen de dieren en directe betrokkenen binnen de pluimveehouderij zouden daar baat bij hebben, ook de samenleving. Jonge vleeskuikens met een goed functionerend aangeboren immuunsysteem zijn namelijk minder vatbaar voor infecties. Dat draagt op zijn beurt bij aan een duurzame pluimveehouderij – in termen van gezondheid, welzijn en efficiënt grondstoffengebruik, en ook in termen van antibioticumgebruik. Een gezondere veestapel maakt gereduceerd antibioticumgebruik mogelijk en verkleint zo de kans op overdracht van antibioticumresistentie naar mensen. Daarnaast wordt ook de kans op overdracht van ziekteverwekkers die bij de mens tot voedselinfecties kunnen leiden gereduceerd.
Het is aannemelijk dat deze fundamentele – en op termijn ook de toegepaste – doelstellingen behaald zullen 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. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om

aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar speelde voor de DEC bij het maken van de ethische afweging geen rol van betekenis. Net zomin als het feit dat het voor de diervoederindustrie van belang kan zijn om eerdergenoemde voederinterventies te kunnen ontwikkelen.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het in kaart brengen van de dynamiek van de darmmicrobiota van vleeskuikens een reëel belang vertegenwoordigt en dat dit reële belang opweegt tegen de 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

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

AVD1080020171005

Bijlagen

1

Datum 10 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 15 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Dynamiek van darmmicrobiota binnen en tussen hokken met vleeskuikens en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven." met aanvraagnummer AVD1080020171005. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Dynamiek van darmmicrobiota binnen en tussen hokken met vleeskuikens en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2017 tot en met 1 juni 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 13 maart 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:
10 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171005

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven



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 juni 2017 tot en met 1 juni 2020, voor het project "Dynamiek van darmmicrobiota binnen en tussen hokken met vleeskuikens en de invloed ervan op uitkomsten van voedingsproeven." met aanvraagnummer AVD1080020171005, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair Docent. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 maart 2017, ontvangen op 15 maart 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Effect van direct en indirect contact tussen vleeskuikens op de samenstelling van de darmmicrobiota				
	Kippen / Vleeskuikens	1.606	Licht	

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. Hierbij is extra aandacht voor de aantallen dieren, wanneer uit deze of andere studies blijkt dat minder dieren nodig zijn.

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.

Aanvraagnummer:
AVD1080020171005

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:
AVD1080020171005

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:
AVD1080020171005

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-09										
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS 20171006	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel			x						
4	Bijlage animal procedure			x						
5	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x		
6	DEC advies			x						
7	Advies CCD		x						x	
8	Beschikking en vergunning				x		x	x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

22 MAART 2017

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30275924
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED], VGZ
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	
Afdeling	
Telefoonnummer	
E-mailadres	

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag
<input checked="" type="checkbox"/> Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
<input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
<input type="checkbox"/> Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of *dierproef* waar al een vergunning voor verleend is?

<input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of *dierproef* waar al een vergunning voor is verleend?

<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum	1 - 8 - 2017
Einddatum	1 - 8 - 2022

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Praktisch onderwijs varken t.b.v. studenten Diergeneeskunde

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Praktisch onderwijs varken t.b.v. studenten Diergeneeskunde

- 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

14





Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

In het diergeneeskundig onderwijs worden veel dierpractica gegeven, waarvan een deel volgens de Wod

wel als dierproef moet worden aangemerkt en een deel niet. Onderwijs in de Bachelor, waar de student de basistechnieken van lichamelijk onderzoek leert, valt niet onder de WoD. Wanneer hiervoor dieren gebruikt worden, die speciaal voor dit of voor ander onderwijs aangekocht zijn, hebben we ervoor gekozen dit in deze aanvraag mee te nemen.

Het praktisch onderwijs is nodig om een aantal redenen:

- (1) Vanuit de Europese en nationale regelgeving (art.1.1 Wet Dieren) wordt in Nederland aan afgestudeerde dierenartsen een algemene bevoegdheid toegekend. Hiervoor zijn eindtermen geformuleerd door de faculteit Diergeneeskunde, waarin duidelijk staat aangegeven waar de student aan het eind van de Bachelor en de Master Diergeneeskunde aan moet voldoen qua kennis en vaardigheden.
- (2) Studenten diergeneeskunde moeten onder gecontroleerde omstandigheden in een gedegen training klinische diagnostiek en andere vaardigheden leren aan "echte" dieren. Onder klinische diagnostiek wordt verstaan het onderzoeken van het dier door ogen, oren, neus en handen evt met behulp van hulpmiddelen als een stethoscoop. Ingrijpende diagnostische handelingen worden hiermee niet bedoeld, tenzij expliciet vermeld. Dit als voorbereiding op de latere beroepsuitoefening, waar studenten met werkelijke patiënten en eigenaren gaan werken. Juist de gecontroleerde omstandigheden maken het onderscheid met het leren in de "echte" praktijk, dat in de laatste fase van de studie echter wel degelijk een belangrijk onderdeel en afsluiting van de opleiding vormt.
- (3) Het praktisch onderwijs is slechts zeer ten dele vervangbaar door andere methoden van onderwijs. Waar mogelijk wordt gebruik gemaakt van technische hulpmiddelen, die het werken met levende dieren vervangen. Dit gebeurt vooral in een eerdere fase van de studie als voorbereiding op het onderwijs met levende dieren. Hierdoor worden de proefdieren minder belast of zijn minder proefdieren nodig. Het gaat in het beschreven onderwijs om een minimale training en voorbereiding op het werken met werkelijke patiënten onder praktijkomstandigheden. Er vindt voortdurende oriëntatie plaats op nieuwe mogelijkheden tot vermindering, vervanging of verfijning.

In de bijlage staan doel en uitvoering meer uitvoerig beschreven.

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?

Doelstelling:

Het in de volle breedte toerusten van toekomstige dierenartsen voor een goede toepassing van preventieve en curatieve diergeneeskunde op het gebied van de varkensgezondheidszorg. Hiertoe is in ieder geval de doelstelling van het onderwijs dat de studenten competent worden in het *lege artis* uitvoeren van (1) klinisch onderzoek, (2) onderzoek en behandeling van zieke dieren, en (3) uitvoeren van verdere interventies, in het kader van onderwijs bij minder bekende of onbekende ziektebeelden op individueel - en bedrijfsniveau.

Haalbaarheid:

Voor het praktisch onderwijs met varkens zoals beschreven in deze aanvraag leggen wij de lat zeer hoog. Deze ambitie sluit ook aan bij de hoge eisen aan kwaliteit voor het onderwijs, welke binnen de gehele faculteit diergeneeskunde worden gesteld. Het goede resultaat hiervan wordt zowel binnen als buiten de faculteit als zodanig erkend. De faculteit Diergeneeskunde in Utrecht staat internationaal zeer hoog aangeschreven. Dit blijkt onder meer uit een accreditatie door de American Veterinary Medical Association (AVMA), als een van de weinige Europese instituten.

3.3 Belang

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

Europese richtlijnen en verordeningen (bv. 853/2004 en 854/2004), vertaald in nationale regelgeving, vragen een opleiding van goed toegeruste dierenartsen. Daarnaast is er het belang voor dier en samenleving, waar voor de dierenarts een belangrijke positie is weggelegd. Het gaat hierbij niet alleen om dierenartsen die precies op de hoogte zijn van wet- en regelgeving, maar die vooral met dieren

kunnen werken, zowel curatief als preventief. Een adequate opleiding tot een dierenarts, die de startcompetenties geeft om aan deze taken invulling te geven, is daarom noodzakelijk.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Om helder te krijgen hoe de plaats van de practica in het onderwijs is, wordt de opbouw van het onderwijs in het kort beschreven. De studenten beginnen met een hele serie basisvakken, die vooral theoretisch van aard zijn. Tegelijk starten zij met het zgn. lijnonderwijs, waarin het klinisch onderzoek wordt getraind. De studenten starten met het leren hanteren en onderzoeken van varkens. Deze practica bestaan uit handelingen die niet als dierproef te beschouwen zijn. Vervolgens wordt een practicum meer gericht op een aantal specifieke aspecten, waarbij het varken geïsoleerd onderzocht kan worden en soms nadere diagnostiek wordt uitgevoerd. Deze varkens worden aangevoerd voor praktisch onderwijs in de Master, maar kunnen, indien ze op een daarvoor geschikt moment aanwezig zijn, ook voor enkele specifieke practica in de Bachelor gebruikt 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 volgende typen practica kunnen worden onderscheiden:

1. Klinisch onderzoek bij varkens onder praktijkomstandigheden, die niet onder een dierproef vallen en op een praktijkbedrijf plaatsvinden. Deze practica worden verder niet beschreven in de onderhavige aanvraag.
2. Klinisch onderzoek bij aangekochte varkens met verschijnselen, waarbij indien noodzakelijk invasieve handelingen verricht worden, die gericht zijn op het stellen van een diagnose. Deze varkens worden in het kader van de didactiek na enkele dagen geëuthanaseerd, waarna sectie plaatsvindt om de klinische bevindingen te relateren aan de postmortale bevindingen en zo de pathofysiologische mechanismen te onderkennen en te begrijpen. Dit onderwijs is erop gericht om de studenten te leren om in de toekomst op een correcte wijze te observeren en te kunnen interveniëren.

Deze dieren kunnen in de Bachelor ook gebruikt worden om klinische diagnostische handelingen te leren, teneinde een waarschijnlijkheidsdiagnose te leren stellen bij dieren met een aandoening.

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

De logische samenhang is dat al deze onderdelen onontbeerlijk zijn voor de latere beroepsuitoefening. De fasering is heel duidelijk aanwezig. Er wordt aangesloten bij de opgedane kennis en vaardigheid alvorens nieuwe onderwijsselementen worden ingebracht.

In de eerste studiefase vinden practica plaats waarbij de studenten varkens leren hanteren en klinisch onderzoeken. Deze practica vinden op een praktijkbedrijf plaats en zijn niet invasief. De systematiek van het klinisch onderzoek, tezamen met een goede kennis van anatomie en fysiologie is essentieel als voorbereiding voor de meer invasieve practica en voor de beroepsuitoefening.

Onder bedrijfsomstandigheden is het klinisch onderzoek niet altijd goed uitvoerbaar, denk hierbij o.a. aan de achtergrondgeluiden die het luisteren naar inwendige organen sterk bemoeilijkt. Wanneer er dieren aanwezig zijn t.b.v. practica in de Master, dan kunnen deze dieren ook worden gebruikt bij practica klinisch onderzoek in de Bachelor. De dieren worden dan alleen klinisch onderzocht en door deze studenten worden geen invasieve handelingen verricht (Dierproef 1). Voor een blok respiratie/circulatie in de Bachelor is het mogelijk dat we dieren met respiratoire verschijnselen speciaal aan moeten kopen.

Daarnaast is er op een praktijkbedrijf geen ruimte om evt. invasieve diagnostische handelingen uit te voeren. Derhalve kopen we van een ander bedrijf dieren met een aandoening aan om klinisch onderzoek te doen gedurende enkele dagen, zodat de student de dieren ook longitudinaal kan volgen en inzicht kan krijgen in het verloop van de aandoening en de veranderingen in de conditie van de varkens. Dit wordt dan aangevuld door nader klinisch onderzoek en postmortaal onderzoek. Een aanvullende reden om van een ander bedrijf aan te kopen is een uitbreiding van het scala van aandoeningen, omdat niet op ieder

bedrijf alle aandoeningen op ieder moment te vinden zijn.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Klinisch onderzoek en evt invasieve diagnostische technieken bij zieke varkens
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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Klinisch onderzoek en evt invasieve diagnostische technieken bij zieke varkens

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De opbouw en naamgeving van het onderwijs, aan de hand waarvan we de dierproeven binnen het varkensonderwijs in de bijlage beschrijven, geldt voor de situatie op het moment van indienen van de projectaanvraag. Aanpassingen in het curriculum voor de opleiding Diergeneeskunde worden regelmatig toegepast in het kader van onderwijsvernieuwing en -optimalisatie. We verwachten echter niet dat eventuele aanpassingen binnen de aangevraagde projectduur zullen zorgen voor grote veranderingen in de algemene opbouw in de handelingen met dieren, die relevant zullen zijn voor deze aanvraag.

Het oplossen van klinische vraagstellingen is dagelijkse praktijk binnen de diergeneeskunde. Dit vereist een systematische manier van denken dat (veterinair) probleemoplossend redeneren in bredere zin wordt genoemd. Het omvat het klinisch redeneren, maar heeft ook wettelijke en ethische aspecten, en aspecten van volksgezondheid. Samen met elementen van professioneel gedrag en technisch instrumentele vaardigheden maken zij een complex beslisproces mogelijk. Het lijnonderwijs is dusdanig opgezet dat studenten al vanaf het eerste jaar kennismaken met zowel (klinische) vaardigheden, (klinisch) redeneren, professioneel gedrag en academische vaardigheden. Hierbij neemt de moeilijkheidsgraad geleidelijk toe en vindt de training eerst alleen met gezonde dieren plaats en daarna pas met patiënten. De training met gezonde dieren vindt plaats op een bedrijf en valt niet onder de Wod.

Hieronder wordt nadere toelichting gegeven over de aanpak van het onderwijs dat valt onder type dierproef 1: Klinisch onderzoek van zieke varkens.

Nadat studenten voldoende basiskennis en -vaardigheden hebben opgedaan in eerder onderwijs (omgaan en hanteren van dieren, klinisch onderzoek en klinisch redeneren) worden voor het blok respiratie/circulatie, lijn 5 en de Master zieke varkens aangekocht om het inzicht in klinisch redeneren te verbeteren. De studenten hebben dan voldoende basis om de zieke varkens correct te onderzoeken in een geconditioneerde omgeving. Veelal is lichamelijk onderzoek in combinatie met de komende pathologie voldoende om een diagnose te stellen, soms is hiervoor nader onderzoek noodzakelijk.

Bij de aankoop van varkens wordt gelet op: 1. diversiteit van verschijnselen, die samenhangen met aandoeningen van verschillende orgaansystemen; 2. Varkens, die in de acute fase van de aandoening zitten; 3. Dat de kans dat het ongerief boven matig ongerief uitkomt in de komende dagen zo klein mogelijk is; 4. Of het verantwoord is het varken te vervoeren en dat het varken komende dagen verantwoord te gebruiken is voor het onderwijs; 5. het zijn gespeende varkens, want zuigende biggen kunnen we niet huisvesten en verzorgen zonder ze te spenen.

Deze biggen worden na enkele dagen geëuthanaseerd en de studenten verrichten sectie op deze dieren, zodat deze uitgedaagd worden om klinische verschijnselen, die waargenomen zijn gedurende het leven te relateren aan de gegevens, die bij sectie verzameld worden.

De varkens worden ook gebruikt tijdens de bachelor in blok respiratie/circulatie om een koppeling te maken tussen klinische gegevens en postmortale gegevens, omdat in het zelfde practicum ook slachthuis materiaal gedemonstreerd wordt. Indien noodzakelijk worden de dieren hiervoor aangekocht.

De dieren, die aangekocht worden voor de Masterfase worden ook gebruikt voor klinisch redeneren in de Bachelorfase. Wanneer er geen dieren aanwezig zijn voor klinisch redeneren in de bachelorfase wordt uitgeweken naar de Tolakker.

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.

Tijdens de practica klinisch redeneren en respiratie/circulatie worden de dieren klinisch onderzocht. Bij het klinisch onderzoek wordt het dier geïnspecteerd, gepalpeerd, geausculteerd en evt gepercuteerd. In de Masterfase worden de dieren dagelijks klinisch onderzocht en evt nader onderzoek uitgevoerd; bijv. anaesthesie van het dier voor het maken van een rontgenfoto, het maken van een ECG, het doen van Broncho-alveolairlavage, bloedprikken, keelwab, ruggenmergpunctie, huidwab/afkrabsel, faecesafname uit het rectum. Dit nader onderzoek wordt uitgevoerd indien dit noodzakelijk is voor het klinisch redeneerproces van de studenten.

De varkens die gebruikt worden in de Masterfase worden op maandag aangevoerd en op donderdagmorgen gedood, waarna er sectie op gedaan wordt. De practica van de bachelorfase zijn in de middag, wanneer er dieren aanwezig zijn. Wanneer er geen dieren aanwezig zijn voor de bachelorfase wordt uitgeweken naar het proefbedrijf.

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

In de bachelorfase stromen jaarlijks 225 studenten in. Deze worden afhankelijk van het type practicum en praktische planning verdeeld in onderwijsgroepen van wisselende grootte. Meestal bestaan de groepen uit 12-15 studenten, hetgeen betekent dat de practica gemiddeld 15-18 maal per studiejaar worden gegeven. Het totale aantal benodigde dieren is afhankelijk van de instroom van de studenten in de Masterfase. Op dit moment wordt er ongeveer 1 big per 2 studenten aangeschaft, waarbij in een oneven groep een student 1 big heeft. Het voordeel van 2 studenten per big is dat ze eerst samen discussiëren over de bevindingen en zo tot diepere inzichten komen. Drie studenten per big geeft weer een afname van de binding met het dier en de aandoening en studenten kunnen zich dan gemakkelijker verschuilen.

Aangezien de biggen gedurende de week steeds meer interactie krijgen met de studenten is een rusttijd tussen de klinische onderzoeken niet nodig.

B. De dieren

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

Onze schatting is dat per jaar maximaal 146 levende varkens (lees gespeende biggen) nodig zijn voor dit type onderwijs. Er beginnen 230 studenten de komende jaren aan de Master, $230/2=115$, 20% marge (22 dieren) vanwege soms incurante groepen plus 5 varkens voor respiratie/circulatie maakt 142 per jaar. Voor 5 jaar wordt dat 710 varkens. Deze varkens worden aangekocht van praktijkbedrijven.

onderwijs	marge	Aantal varkens
230 Masterstudenten	20%	$115+22=137$
Bachelor (respiratie/circulatie)	0	5

Bachelor(keuzevak KPI)	Indien varkens aanwezig zijn.	4
Practica klinisch redeneren	Indien varkens aanwezig zijn.	0 extra
		142/jaar

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.

Hierbij wordt uitgegaan van de voorwaarden genoemd in de Wod, zijnde het maximale ongerief, algemene gezondheids- en welzijnstoestand, het ongerief van de volgende dierproef en een deskundig diergeneeskundig advies.

Alle dieren worden aan een dagelijkse monitoring onderworpen, waarbij het al dan niet bereikt zijn van het humaan eindpunt meegenomen wordt, daar het zieke dieren betreft. Indien het humaan eindpunt bereikt is, wordt het varken voortijdig geëuthanaseerd.

De dieren worden enkele keren per jaar hergebruikt voor practica in de Bachelor, indien deze in de tijd geroosterd zijn wanneer de varkens aanwezig zijn.

Wanneer het naar oordeel van de begeleidend dierenarts niet verstandig is om een varken dat is aangekocht voor onderwijs in de Masterfase, ook in de bachelorfase voor het onderwijs te gebruiken, ondanks dat het humaan eindpunt nog niet bereikt is, wordt het varken hiervoor niet ingezet.

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:

Er wordt zoveel mogelijk gebruik gemaakt van technische hulpmiddelen. Ter voorbereiding op het hanteren en klinisch onderzoek zijn o.a. video's voor studenten online beschikbaar.

En onze zoektocht naar en oriëntatie op verdere verfijnde methodieken (bijv. Breeding Betsy, een kunstkoe, die studenten gebruiken om te oefenen in rectaal exploreren) blijft doorgaan. Echter, ondanks deze hulpmiddelen blijft het daarnaast noodzakelijk dat studenten met levende dieren kunnen oefenen in hanteren en klinisch onderzoek ter voorbereiding op de beroepspraktijk.

Vermindering:

Er wordt regelmatig geïnventariseerd hoeveel dieren voor welk type onderwijs nodig zijn, zodat deze zo efficiënt mogelijk kunnen worden aangekocht of hergebruikt. Het hergebruik van de dieren en een minimaal en maximaal aantal studenten per dier beoogt een optimale inzet van proefdieren.

Voor Master studenten is een dier per twee studenten beschikbaar. Vroeger was er een dier per student, dit heeft voordelen m.b.t. verantwoordelijkheid. Om didactische redenen zijn we naar een dier per 2 studenten gegaan. De verantwoordelijkheid van de student voor het dier proberen we te behouden, anderzijds hopen we in de discussie met de studenten op meer diepgang, omdat ze de discussiepunten eerste met elkaar kunnen bespreken en samen meer literatuur kunnen lezen. Daarnaast neemt de belasting per dier niet toe, omdat het dier door 1 student klinisch onderzocht wordt.

Verfijning:

Huisvesting en verzorging worden specifiek afgestemd op de varkens die worden gehouden. De dieren worden dagelijks gemonitord door diervverzorgers en iedere dag uitgebreid klinisch onderzocht. Er is een diergezondheidsadministratie, waar alle gegevens van de monitoring worden geregistreerd. Alle diergeneeskundige handelingen vinden plaats onder begeleiding van een ervaren docent-dierenarts. Het doden van de dieren wordt ook door de studenten onder verantwoordelijkheid van een dierenarts uitgevoerd. Voor de meeste studenten geldt dat dit de eerste keer is dat ze een dier doden en dus is er veel begeleidingstijd hiervoor gereserveerd.

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 varkens worden in groepen gehouden in een rustige omgeving die aansluit bij hun behoeften wat betreft management van klimaat, licht, voer en watervoorziening.
2. Het welzijn en de gezondheid van de dieren wordt elke dag gecontroleerd. Hierdoor worden eventuele welzijnsaantastingen snel gesignaleerd en kan snel worden ingegrepen door aanpassingen in het management, een passende behandeling of euthanasie wanneer het humaan eindpunt bereikt is.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Niet van toepassing

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

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.

Indien de verantwoordelijk dierenarts vindt dat de dieren als gevolg van hun aandoening pijn ervaren, zal

pijnstilling toegediend worden. Indien het humaan eindpunt bereikt is, wordt het dier na voorafgaande sedatie geëuthanaseerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Als direct gevolg van de practica zijn aantastingen van welzijn nauwelijks te verwachten.
- Soms verzet het dier zich tegen een onderzoek. Dan zal het dier op een later moment onderzocht worden.
- Wanneer nader onderzoek moet plaatsvinden, zal dit meestal onder anaesthesie plaatsvinden
- Wanneer de dieren worden geëuthanaseerd, geldt dat de handelingen direct voorafgaand aan het euthanaseren mogelijk kortdurende onrust of stress geven.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Onwennigheid aan menselijke aanraking kan verzet tot gevolg hebben. Door op een zachte en doortastende manier tewerk te gaan kan verzet verminderd worden
- Soms is het nader onderzoek ingrijpend: rontgenfoto, het maken van een ECG, het doen van Broncho-alveolairlavage.

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

Als een dier zich verzet, wordt het dier langzaam aan de handeling blootgesteld, waardoor het dier dit toelaat. Indien verwacht wordt dat het dier zich zal verzetten, bijv bij een otoscopie, dat wordt het dier voorafgaand gesedeerd. Sedatie/anaesthesie wordt gebruikt bij veel nader onderzoek (rontgenfoto, het maken van een ECG, het doen van Broncho-alveolairlavage). Ruggenmergpunctie wordt uitgevoerd wanneer het dier geëuthanaseerd is.

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.

Gehanteerde criteria ten aanzien van dierwelzijn en humaan eindpunt

- Een van de belangrijke doelen voor het Master co-schap is de follow-up van de patiënten. Medicatie kan het ziekteverloop beïnvloeden en vanuit dit oogpunt wordt daar terughoudend mee omgegaan. Wanneer er naar het oordeel van de begeleidende dierenarts pijnstilling nodig is, wordt dit echter altijd toegediend.
- Humaan eindpunt: wanneer het lijden van een patiënt niet langer opweegt tegen het nut dat deze patiënt voor het onderwijs heeft, wordt het dier eerder geëuthanaseerd.
- Indien het ongerief voor het dier meer dan matig dreigt te worden, wordt het dier geëuthanaseerd.

Criteria:

Doel van het formuleren van deze criteria is het nauwkeurig vastleggen van het "vroegste" eindpunt.

De volgende criteria worden gehanteerd:

1. Algemene uitgangspunten:

- a. Het 'Analogieprincipe'
- b. Het voorkomen van spontaan dood gaan/ernstige pijn
- c. Het minimaliseren van de duur van ongerief

2. Specifieke criteria (mede op basis van het uitgevoerde klinisch onderzoek, observaties, verslaglegging & monitoring):

De varkens krijgen, indien er verschijnselen van pijn waargenomen worden, adequate pijnstilling toegediend. Een varken heeft een drive om te eten en drinken, derhalve is het belangrijkste criterium om varkens te euthanaseren:

- niet meer eten en/of drinken: Als een varken stopt met eten en drinken, dan is het varken lijdende.
- sterk vermageren (in de tijd; monitoring BCS/± 20% verlies in 2 dagen)
- duidelijke pijngeluiden (tandenknarsen, kreunen)
- sterk verhoogde pols en ademhaling t.g.v. hevige benauwdheid
- wanneer het niet mogelijk blijkt de verschijnselen van pijn d.m.v. pijnstilling weg te nemen

3. Omdat het gaat om individuele patiënten die de betreffende ziektebeelden in verschillende gradaties kunnen ontwikkelen, zal voor elk dier opnieuw deze afweging gemaakt moeten worden. De verantwoordelijkheid hiervoor ligt altijd bij de begeleidende dierenarts.
4. Als het varken niet meer functioneel is in het onderwijs, zelfs als het dier gering lijdt, wordt deze geëuthanaseerd.

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

Er worden zieke dieren aangekocht. Criterium bij het uitzoeken is dat de dieren zonder aantasting van het welzijn 3 dagen kunnen leven. Echter door vervoer en door continuering van het ziekteproces kan het humane eindpunt bereikt worden. We verwachten op basis van ervaringen uit het verleden dat we minder dan 10% voortijdig moeten euthanaseren.

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.

Alleen dieren met verschijnselen van een aandoening, die licht ongerief tot gevolg heeft, worden aangekocht.

Hoewel voor dit type onderwijs dus geldt dat veel handelingen minder ongerief geven dan het toedienen van een injectie, maakt de herhaling van deze handelingen of de combinatie binnen hetzelfde practicum met handelingen die licht ongerief geven dat we ervan uitgaan dat 100% van het aantal aangevraagde dieren valt binnen de categorie licht ongerief.

Alleen voor bepaalde diagnostische handelingen zal het ongerief matig zijn, bijv die handelingen, die met anaesthesie gepaard gaan, zoals broncho-alveolair lavage, het maken van een Röntgenfoto, otoscopie. Indien twee van deze handelingen noodzakelijk zijn worden deze gecombineerd, zodat het dier slechts eenmalig geanaestheseerd behoeft te worden. Gebaseerd op de ervaringen uit het verleden zal ongeveer 10 % matig ongerief ondervinden t.g.v. nader onderzoek.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dieren worden na doding door de studenten pathologisch onderzocht als essentieel onderdeel van hun leerproces.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[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
AVD1080020171006

Bijlagen

2

Datum 16 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 maart 2017. Het gaat om uw project "Praktisch onderwijs varken t.b.v. studenten Diergeneeskunde". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1080020171006. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

16 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020171006

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
16 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171006

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 augustus 2017
Geplande einddatum: 1 augustus 2022
Titel project: Praktisch onderwijs varken t.b.v. studenten Diergeneeskunde
Titel niet-technische samenvatting: Praktisch onderwijs varken t.b.v. studenten Diergeneeskunde
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
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:

14 maart 2017

Datum:

16 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020171006



> 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
AVD1080020171006
Bijlagen
2

Datum 16 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 maart 2017
Vervaldatum: 15 april 2017
Factuurnummer: 171006
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1080020171006	€ 935,00

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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.II.803.027
2. Titel van het project : Praktisch onderwijs varken t.b.v. studenten Diergeneeskunde
3. Titel van de NTS : Praktisch onderwijs varken t.b.v. studenten Diergeneeskunde

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: 06-01-2017
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 18-01-2017
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 24-01-2017/25-02-2016
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 09-03-2017

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: 24-01-2017
- Datum antwoord: 25-02-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- Algemene opmerking: Het projectvoorstel kan korter, bondiger en zakelijker opgeschreven worden. Daarnaast is het projectvoorstel onvoldoende navolgbaar; bepaalde belangrijke informatie over handelingen en bijbehorend ongerief dienen uitgebreider te worden vermeld.
Een en ander is verhelderd in de onderwijsaanvraag.
- 3.1 Achtergrond: Het was helderder geweest als in het begin explicieter gemeld was dat dit onderwijs voor de bachelor- en de masterfase betreft en wat de samenhang is tussen beiden (bijvoorbeeld met behulp van een tabel/schema).
Een en ander is verhelderd in de onderwijsaanvraag.
- 3.2 Doel: De haalbaarheid dient korter, algemener en minder subjectief verwoord te worden. Tevens raadt de DEC u aan om te refereren naar internationale en nationale accreditatie.
Het doel is een stuk korter geformuleerd.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC verzoekt u duidelijker te vermelden welke handelingen worden uitgevoerd door de bachelorstudenten en welke handelingen door de masterstudenten. Een schematische weergave zou verhelderend kunnen werken.
Een en ander is verhelderd in de onderwijsaanvraag.
- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.2: U noemt hier dat er dieren worden uitgezocht met een 'aandoening'. Dit klopt niet en is bovendien te vaag. De dieren worden uitgezocht op basis van 'symptomen'. Wat de aandoening is blijkt later wanneer de dieren onderzocht worden. Graag wijzigen.
Dit is gewijzigd.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij resumerend staat: "*Naast bovenstaande handelingen valt onder type dierproef 1 tevens het oefenen / trainen van medewerkers voor bijv bloedtappen*". Dit komt voor de DEC uit de lucht vallen. De DEC snapt dat deze handelingen goed meegenomen kunnen worden in deze onderwijsaanvraag, maar dit dient dan ook te worden opgenomen in het projectvoorstel (achtergrond, doel, strategie).
Het verzoek om medewerkers te trainen heb ik laten vallen.
- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Daarnaast schrijft u dat enkele varkens met respiratoire klachten worden aangekocht voor de Bachelor. De DEC had tot nu toe het idee dat de dieren voor de masterstudenten werden aangekocht, en dat de dieren eventueel ook voor de bachelorstudenten gebruikt konden worden, maar hieruit blijkt dat dat niet zo is. Graag verhelderen en evt. ook al noemen in het projectvoorstel.
Tot op heden zijn er geen dieren voor dit doel aangekocht, verzoek is om dit wel te mogen doen.
- B. De dieren: Het is de DEC niet helder waar de aanvraag voor 4 extra varkens op berust. Graag verhelderen.

Dat was voor een keuzevak, maar hiertoe worden geen extra dieren aangekocht en mag dus vervallen. Vandaar de aanpassing in het totaal aantal aangevraagde dieren.

- D. Vervanging: Graag ook kort uitleggen wie/wat breeding Betsy is.
Dit is nu uitgelegd in de onderwijsaanvraag.
 - D. Vervanging: In de laatste zin heeft u het over 'practica'. Gaat dit over practica in de bachelor- of masterfase? Graag verhelderen.
Dit gaat over beiden.
 - K. Classificatie van ongerief: U schrijft dat u de intentie heeft om alleen zieke dieren met licht ongerief mee te nemen, maar zoals het nu verwoord is staat het er wat verwarrend. Graag herformuleren.
Dit is gewijzigd.
 - K. Classificatie van ongerief: Het ongerief ten gevolge van de mogelijke onderliggende aandoening wordt niet genoemd, alleen het ongerief als gevolg van de handelingen. Dit dient nog te worden opgenomen.
Dit is nu opgenomen in de onderwijsaanvraag.
- 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. Dierenartsen dragen met hun werk bij aan de gezondheid en het welzijn van dieren, en aan het bewaken van volksgezondheid en voedselveiligheid. Om deze rol goed te kunnen vervullen moeten dierenartsen een aantal praktische vaardigheden beheersen. Het doel van de voorliggende projectaanvraag is om studenten diergeneeskunde kennis te laten maken en/of te trainen in het uitvoeren van vaardigheden die van belang zijn voor de preventieve en curatieve varkensgeneeskunde. Door deze vaardigheden tijdens de opleiding onder gecontroleerde omstandigheden te oefenen op onderwijsdieren worden studenten goed voorbereid op het toepassen van deze vaardigheden

onder praktijkomstandigheden – zowel in de laatste fase van de studie als tijdens de beroepsuitoefening.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Op basis van de Europese transportverordening mag geen ziek of zwak vee worden vervoerd. Voor dit project is echter ontheffing voor het vervoer van ziek en zwak vee.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het geven van praktisch onderwijs aan studenten Diergeneeskunde op het gebied van klinisch onderzoek en diagnostiek bij zieke varkens. Het uiteindelijke doel van het project is het in de volle breedte toerusten van toekomstige dierenartsen voor een goede toepassing van preventieve en curatieve diergeneeskunde op het gebied van de varkensgezondheidszorg. Het onderwijs dat in de voorliggende projectaanvraag beschreven wordt draagt bij aan het bereiken van de onderwijsdoelstellingen die in het curriculum van de opleiding Diergeneeskunde beschreven worden. 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 studenten en docenten van de faculteit Diergeneeskunde, en de samenleving. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de studenten en docenten worden bevorderd zijn: welzijn en rechtvaardigheid (het kunnen ontvangen resp. geven van kwalitatief goed onderwijs). De morele waarden die voor de samenleving worden bevorderd zijn: welzijn en rechtvaardigheid (goed opgeleide dierenartsen dragen bij aan het bewaken van volksgezondheid en voedselveiligheid, en gezondheid en welzijn van dieren).
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

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. Het behalen van de leerdoelen wordt getoetst, en de onderwijskwaliteit wordt regelmatig geëvalueerd en zowel binnen als buiten de faculteit erkend.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde opzet van het onderwijs sluit logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen, en de gekozen strategie kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In de projectaanvraag is helder uiteengezet op welke manier het onderwijs met betrekking tot de varkensgezondheidszorg is opgebouwd, en welke plaats het beschreven masteronderwijs (en andere type dierproeven) daarbij innemen. Voor het masteronderwijs worden zieke varkens aangekocht van reguliere varkensbedrijven, getransporteerd naar de faculteit Diergeneeskunde, en aldaar in een onderwijssetting gedurende enkele dagen vervolgd. Studenten krijgen de gelegenheid om zich met behulp van klinisch onderzoek en diagnostische handelingen een beeld te vormen van het verloop van de ziektesymptomen en de onderliggende aandoening. Na enkele dagen worden de varkens geëuthanaseerd, waarna sectie plaatsvindt om de klinische bevindingen te relateren aan de postmortale bevindingen en zo de pathofysiologische mechanismen te onderkennen en te begrijpen.

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 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)
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. Voor alle dieren geldt dat zij maximaal matig ongerief zullen ondervinden. Dit ongerief is het gevolg van het transport naar de faculteit Diergeneeskunde, van de diagnostische handelingen die uitgevoerd worden, en van de onderliggende (door de studenten gedurende het onderwijs te diagnosticeren) aandoening.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek en mentaal aangetast. De dieren ondergaan verschillende diagnostische handelingen, waarvoor in sommige gevallen anesthesie vereist is, en worden aan het einde van het practicum gedood ten behoeve van pathologisch onderzoek.

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. Op de varkensbedrijven worden alleen dieren geselecteerd waarvan men verwacht dat zij zonder ernstige aantasting van het welzijn nog drie dagen in leven kunnen blijven ten behoeve van het onderwijs. Het is echter mogelijk dat het ziekteproces bij enkele dieren zodanig verloopt dat de dieren meer dan matig ongerief zouden kunnen ervaren. Wanneer de dierenarts (samen met de studenten) een dergelijke situatie bij een dier vaststelt, dan wordt het betreffende dier voortijdig geëuthanaseerd. Men houdt er rekening mee dat maximaal 10% van de dieren voortijdig geëuthanaseerd moet worden.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Om dierenartsen in de volle breedte toe te rusten voor de preventieve en curatieve varkensgezondheidszorg is het van groot belang dat zij tijdens de opleiding kennis maken en ervaring opdoen met handelingen bij levende zieke dieren. De handelingen die tijdens de practica aan bod komen zijn essentieel voor de latere beroepsuitoefening, en er zijn geen volwaardige alternatieven beschikbaar die het onderwijs met levende zieke dieren kunnen vervangen. Het masteronderwijs dat in het voorliggende project wordt beschreven heeft een uniek karakter: het biedt studenten niet alleen de mogelijkheid om een ziekteproces in een levend dier gedurende een aantal dagen te vervolgen, en maakt het ook mogelijk om pathologische bevindingen na euthanasie te koppelen aan symptomen die men in de dagen ervoor bij het levende zieke dier heeft kunnen waarnemen. Dankzij deze opzet brengt het masteronderwijs verschillende onderwijselementen van de studie Diergeneeskunde bij elkaar, en verschaft het de studenten belangrijke inzichten.
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. De berekening van het aantal benodigde dieren is gebaseerd op het aantal studenten dat jaarlijks instroomt, het aantal studenten dat met het oog op de onderwijsdoelstelling per keer aan een practicum kan deelnemen en het aantal keren dat een practicum kan plaatsvinden. De dieren worden zo efficiënt mogelijk ingezet door ze niet alleen voor masteronderwijs, maar daar waar mogelijk ook voor bacheloronderwijs in te zetten.
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. De onderwijsgroep heeft veel expertise op het gebied van de varkensgezondheidszorg. Alle handelingen worden uitgevoerd onder toezicht/begeleiding van een ervaren dierenarts. Door de aard van het onderwijs is dagelijkse uitgebreide monitoring van de dieren gewaarborgd, en zal onverwacht ongerief tijdig opgemerkt worden. Omdat medicatie invloed kan hebben op het verloop van een aandoening wordt daar terughoudend mee omgegaan. Maar zodra naar oordeel van de begeleidende dierenarts pijnstilling noodzakelijk is, dan zal dit altijd worden

toegediend. Het voordeel van de aanpak die in deze projectaanvraag beschreven wordt is, dat de dieren die afkomstig zijn van gangbare varkensbedrijven reeds een breed scala aan symptomen en onderliggende aandoeningen hebben, waardoor deze aandoeningen – en het daarmee gepaard gaande ongerief – niet geïnduceerd hoeven worden bij gezonde dieren.

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, met dien verstande dat de dieren op basis van symptomen – en niet op basis van geslacht – geselecteerd worden. Mochten beide geslachten daardoor niet in gelijke mate worden ingezet, dan heeft dit geen consequenties voor in voorraad gedode dieren, aangezien het in deze aanvraag geen dieren betreft die voor dierproeven gefokt worden.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstelling van het project alleen behaald kan worden wanneer studenten pathologisch onderzoek kunnen uitvoeren. De dieren worden volgens een passende en in bijlage IV van de EU richtlijn genoemde methode gedood.
20. Omdat de varkens in het projectvoorstel worden gedood in het kader van het beschreven onderwijs 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 belang van het voorliggende project, dat tot doel heeft studenten Diergeneeskunde te onderwijzen op het gebied van klinisch onderzoek en diagnostiek bij zieke varkens, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren?
2. In het voorliggende project wordt het welzijn en de integriteit van varkens aangetast, wat gepaard gaat met licht tot matig ongerief. Daar staat tegenover dat van dit project verwacht mag worden dat het bijdraagt aan het in de volle breedte toerusten van toekomstige dierenartsen voor een goede toepassing van preventieve en curatieve diergeneeskunde op het gebied van de varkensgezondheidszorg. Niet alleen de studenten, docenten en betrokkenen binnen de varkenshouderij hebben daar baat bij, ook de samenleving. Het is voor de samenleving namelijk van belang dat dierenartsen niet alleen zorg kunnen dragen voor gezondheid en welzijn van dieren, maar ook in staat zijn om de volksgezondheid en

voedselveiligheid te bewaken. Het is aannemelijk dat de onderwijsdoelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de betrokken docenten/dierenartsen doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het onderwijzen van studenten Diergeneeskunde op het gebied van klinisch onderzoek en diagnostiek bij zieke varkens een reëel belang vertegenwoordigt, en dat dit reële belang opweegt tegen de 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. Het volgende knelpunt is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies: de DEC heeft uitgebreid gediscussieerd over de juiste definiëring van de humane eindpunten. Het blijkt dat het lastig is om – bij dieren in het algemeen en bij varkens in het bijzonder – criteria op te stellen op grond waarvan men onderscheid kan maken tussen matig en ernstig ongerief. In de loop van de discussie zijn de DEC-leden het erover eens geworden dat men de geformuleerde humane eindpunten niet moet interpreteren als de garantie dat een varken bepaalde verschijnselen en daarmee gepaard gaand (in dit geval ernstig) ongerief niet zal ondervinden, maar als een leidraad voor de inspanningen die men zal verrichten om te voorkomen dat de aandoening en het ongerief zich zodanig ontwikkelen dat een dier ernstig ongerief ondervindt. Of dit lukt hangt onder andere af van van de aard en de progressie van de aandoening, van de observatiefrequentie, en van het vermogen van de observator om de juiste inschatting te maken. De DEC is ervan overtuigd dat een zorgvuldige selectie van de dieren op de varkensbedrijven en de dagelijkse monitoring door ervaren en kundige dierenartsen (samen met kritische en geëngageerde studenten) eraan bijdragen dat het ongerief voor de dieren tot een minimum wordt beperkt.



> 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

AVD1080020171006

Bijlagen

1

Datum 10 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Praktisch onderwijs varken t.b.v. studenten Diergeneeskunde" met aanvraagnummer AVD1080020171006. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Praktisch onderwijs varken t.b.v. studenten Diergeneeskunde" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Ziek of zwak vee mag niet zonder ontheffing van de NVWA worden vervoerd.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 9 maart 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:
10 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171006

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:

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 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Praktisch onderwijs varken t.b.v. studenten Diergeneeskunde" met aanvraagnummer AVD1080020171006, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair Hoofddocent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 maart 2017, ontvangen op 15 maart 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Klinisch onderzoek en evt invasieve diagnostische technieken bij zieke varkens				
	Varkens (<i>Sus scrofa domestica</i>) /	710	10% Matig 90% Licht	

Voorwaarden

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

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.

Aanvraagnummer:
AVD1080020171006

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:
AVD1080020171006

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:
AVD1080020171006

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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