

Inventaris Wob-verzoek W17-12										
nr.	document NTS 20172064	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel			x						
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x						
5	DEC-advies				x		x	x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Aanvullende informatie				x		x	x		
8	Adviesnota CCD		x							x
9	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	50100
		<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	TNO
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	27376655
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	
		Postbus	96800
		Postcode en plaats	2509 JE DEN HAAG
		IBAN	NL39INGB0657819271
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	TNO
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Onderzoeker
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Onderzoeker
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 01 - 2018 |
| Einddatum | 31 - 12 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Prevention and treatment of metabolic disorders.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De preventie en behandeling van metabole ziekten.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------------------|
| Naam DEC | DEC-TNO |
| Postadres | 96800 2509 JE DEN HAAG |
| E-mailadres | |

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.
 s.v.p. uw factuur o.v.v. 'vooruitbetaling' en het bestelnummer 3100165835/1 indienen via e-mail bij [redacted] adres:
 TNO T.a.v. Accounts Payable
 Postbus 96829
 2509 JE DEN HAAG

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 Den Haag





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'. 50100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. The Netherlands Organisation for Applied Scientific Research (TNO)
- 1.3 Provide the title of the project. Prevention and treatment of metabolic disorders.

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.

Excess intake of energy rich diets with high levels of sugars and saturated fat in combination with a sedentary lifestyle has resulted in a worldwide epidemic of obesity and associated metabolic disorders. Metabolism is the concerted interplay of several organs (gut, liver, adipose tissue, muscle, vascular system) that interact in an orchestrated way to provide energy from food and distribute it to the other

organs (e.g. heart, brain) or use it for storage purposes (typically in adipose tissue, liver, muscle). Importantly, each organ is responsible for a specific step in the metabolic chain and has a role in metabolic homeostasis (for instance to keep the concentration of glucose and lipids at constant levels). A disturbance in this chain of metabolic events results in metabolic disease indicators such as abdominal obesity (excess storage of lipids), hyperlipidemia (high lipid levels), impaired glucose tolerance (uncontrolled glucose levels), hypertension (impaired vessel function) or insulin resistance (inadequate response of metabolic organs to insulin). These metabolic disorders often tend to cluster together and especially the combination, called Metabolic Syndrome, poses a major risk for further complications. While the precise definition of Metabolic Syndrome remains debated, it is unambiguously clear that combinations of metabolic disorders lead to an enhanced risk for the development cardiovascular disease and Type 2 Diabetes. These different metabolic disorders are undoubtedly related and interconnected (because metabolic dysfunction of one organ directly affects the function of the other organs in the metabolic chain) and are often sharing similar underlying mechanisms. Clustering of metabolic anomalies does not only lead to an enhanced risk for cardiovascular diseases and Type 2 Diabetes, but also other complications, like liver diseases as non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatic fibrosis, nephropathy (in kidney) and microvascular disease (in retina and brain) can occur. Since humans differ in the metabolic capacity of their organs (from person to person), the disease typically manifests in the 'weakest organ with lowest capacity' and most patients develop one or more of the different pathologies of the Metabolic Syndrome simultaneously. Due to this cohesion between the different metabolic disorders, their simultaneous occurrence and similar underlying mechanisms, the Metabolic Syndrome can be considered as one disease. Life-style changes are the preferred treatment, however the increasing incidence of these metabolic disorders and complications thereof, warrants further development of pharmacological approaches as well.

At our department, we work on the full spectrum of metabolic health, metabolic disease and complications thereof (Figure 1) and aim to attenuate their development (e.g. by lifestyle and nutritional or pharmacological interventions). In general, the overall theme of our research is to understand the transitions from metabolic healthy towards metabolic disorders and towards the development of complications, and to unravel the underlying mechanisms. All in order to investigate whether it is possible to prevent these transitions or intervene to reverse them. An essential step in developing novel therapies is to demonstrate efficacy on key risk factors and/or disease endpoints in a preclinical setting before authorities allow testing of a novel therapy in humans (e.g. a clinical trial). Although in vitro models and in silico models are most helpful in studying parts of the Metabolic Syndrome, the complex organ-organ interactions that are intrinsic to metabolism and metabolic disorders make it currently unavoidable to use animal models to study the Metabolic Syndrome and develop new therapies. In the past 30 years, TNO has developed a broad portfolio of in vivo models that allow detailed analysis of different aspects of metabolic disorders. For instance, an extensive historical database of preclinical studies allows an evidence-based selection of a diet with optimal composition in combination with an optimal mouse strain to address a specific question. Through our portfolio, we support both the nutrition & pharmaceutical industry as well as academia and medical centers in the development of new therapy options. We strive to continuously incorporate new insights and technologies in our portfolio to offer the best possible preclinical research tools.

Patients with Metabolic Syndrome may have different disease stages. Therefore, the research on metabolic disease development can be divided into two main (consecutive) stages (see Figure 1): **metabolic disorders** develop in first place (first stage) which give rise to **metabolic complications** that may emerge as a consequence (second stage). As a rule of thumb, metabolic disorder is thought to be (partially) reversible whereas second stage disease processes can involve tissue damage with a more irreversible phenotype.

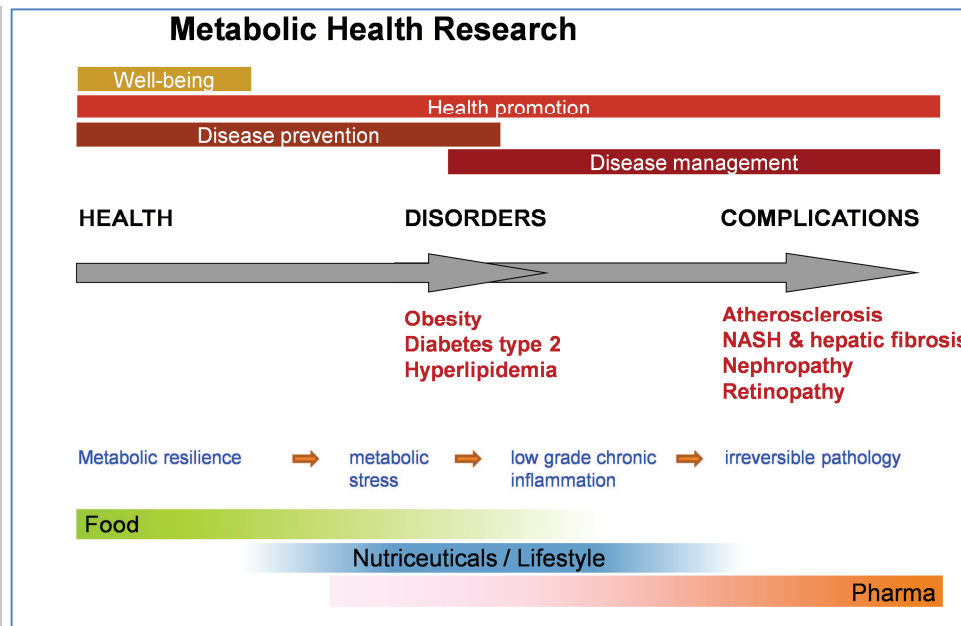


Figure 1. The research area of our department, Metabolic Health Research.

1. Metabolic disorders (first stage)

Nowadays, in our Western society food is in abundance and energy rich which contain high levels of sugars and saturated fat, and the same holds true for developing countries. For the first time in history, there are more subjects suffering from overweight and obesity than from hunger.

If a situation of nutritional abundance persists only shortly, the body can still cope with this metabolic stressor and we speak of metabolic resilience, which is still considered a healthy situation. The problems arise when the period of nutritional abundance is long-lasting or when there are too many metabolic stressors (e.g. from food, from drinks, at day and night etc). In this situation the body cannot cope with the metabolic stressor anymore, and metabolic stress occurs in the weakest organ (which varies from subject to subject) and metabolic disorders will develop. At our department we investigate the sequence of events during the development of metabolic disorders (for knowledge on improved diagnosis and monitoring) and try to attenuate pathological processes or reverse them via treatments that are based on this knowledge. Different metabolic disorders are studied, for instance: **obesity** (with fatty liver disease), **Type 2 Diabetes**, **hyperlipidemia** and/or combinations thereof (essentially as in patients with Metabolic Syndrome who develop these pathologies simultaneously).

2. Metabolic complications (second stage)

After a prolonged period of metabolic disorders, multiple complications can develop. For instance, when the hyperlipidemic time period becomes too long, **atherosclerosis** will develop. Likewise, chronic hyperglycemia and insulin resistance (Type 2 Diabetes) typically leads to complications like **nephropathy** or complications of the small blood vessels that supply the retina (microvascular disease) which manifests in patients as **retinopathy**. In the case of the liver, fatty liver disease can progress further towards non-alcoholic steatohepatitis (**NASH**), a condition characterized by both hepatic lipid accumulation and hepatic inflammation which leads to damage and (irreversible) liver fibrosis, because scar tissue will replace the normal liver cells.

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?

Our ultimate aim is to maintain metabolic health and prevent the development of metabolic disorders and their complications. Our direct aim for the next 5 years is to gain better understanding of the

underlying mechanisms that drive metabolic disorders and to contribute to the prevention and/or treatment (via nutritional or pharmacological interventions) of metabolic disease development. To this end, novel therapeutic strategies will be tested in our translational models to contribute as much as possible to the prediction of the ultimate clinical effectiveness.

In general, the overall theme of our research is to understand the transitions from natural metabolic homeostasis towards metabolic disorders and towards the development of complications. In addition, to unravel the underlying mechanisms in order to investigate whether it is possible to prevent these transitions or intervene to reverse them.

Depending on the disease stage, the purpose of a study can be:

- To monitor metabolic disorder development and prevent, attenuate or reverse the disease development.
- To monitor the development of disease complications and try to prevent attenuate or reverse their development.

The specific research question of a study will depend on the type of metabolic disorder being studied and an example is shown in the appendix.

Approximately 70% of our studies will be applied research performed to investigate the efficacy of novel treatments against a metabolic disease and aim at investigating to which extent the treatment can prevent or improve the metabolic disease.

In addition, about 20% of our studies is translational research performed to investigate the underlying working mechanism of a novel candidate therapy or identify biomarkers that can be translated to clinic. For instance if a compound was shown to have beneficial effects on hyperlipidemia and could reduce plasma cholesterol and triglycerides, a next study could be performed to investigate the mechanism of this reduction.

Besides directly testing different prevention- or intervention-therapies, approximately 10% fundamental research studies are performed that aim to understand the underlying mechanisms of the disease. For understanding the disease development, time-course studies can be performed in which groups of animals are compared after different time periods on a metabolic stressor (for instance different periods of high fat diet feeding that lead to liver disease: steatosis, liver inflammation, NASH/fibrosis development). As mentioned before, we would also like to understand the underlying mechanisms that are involved in the transition from healthy homeostasis towards metabolic disorders and from metabolic disorders towards metabolic complications. For instance, why do some people with Diabetes develop certain complications and others do not (how do these groups differ)? Animal studies that compare the animals that do develop complications after application of a certain metabolic stressor with animals that do not develop these complications (despite being exposed to the same stressor) can help to understand the underlying mechanisms that play a role, and unravel protective mechanisms. Also fundamental research studies can be performed to evaluate a novel therapeutic target. These studies are not directly aimed at treatment of disease but are first investigating the role of a specific pathway or protein within the disease development to see whether this could be a potential target for treatment.

For all of our studies, it is very important that we use translational models that reflect the disease situation in humans as much as possible. We are continuously working on improving our in vivo models. Therefore also fundamental studies can be performed aimed at developing a novel model or improving existing models. An improvement of the model could be via adaptations of the diets used to induce the disease or by genetic interventions, for instance via cross-breeding of different transgenic mice, resulting in a novel animal model with a desired phenotype. A cross-bred of ApoE*3Leiden with GK+/- mice (hyperglycemic and diabetic mice due to the diminished expression of glucokinase enzyme) can be expected. The latter cross-bred does not lead to discomfort. Similarly as in humans, that are often unaware of their metabolic disorders, until a very late stage. Other cross-breedings could be performed as well. Cross-breedings that will lead to discomfort will be requested in an amendment.

Although not every study in itself (especially the more fundamental research studies/studies designed for model development/improvement) is directly aimed at treatment of metabolic disease, all studies all together are aimed to prevent or to treat metabolic disorders and their complications.

This project has a high feasibility:

Within the strategy of TNO, Healthy Living is one of the five focus areas. Within the focus area of Healthy Living research is being done that varies from the development of healthy and safe food, children growing up healthily or working healthily to predictive health technologies. A substantial portion of the research is dedicated to education, prevention and treatment, either commissioned by the government or in collaboration with academia or industry. The research described in this project is embedded within the theme of predictive health technologies that aims to have a better understanding of health and diseases. For the research described in this project, focusing on metabolic disorders, TNO has an extensive track record, resulting in more than 150 peer-reviewed international publications. Researchers within the group are already more than 20 years working in the field of cardiovascular and metabolic diseases. As example, we mention several (mechanistical) studies with different statins, fibrates (PPAR- α agonists), niacin, CETP-inhibitors, PCSK9 antibodies, phytosterols, polyunsaturated fatty acids, GLP-1 inhibitors, exendin, glitazones (PPAR- γ agonists), bile acid sequestrants. Some of these studies have been used for FDA filing. A large network has been built within both the academic world and the pharmaceutical industry, nutritional companies, as well as biotech companies, academic medical centers, patient organizations and governments. Within this network we have conducted over the past 15 years more than 150 cooperation projects (both bilaterally and in larger consortia). Our previous achievements makes it very likely that with the experiments described in this project we will make large contributions to our main research questions.

3.3 Relevance

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

Presumably due to changes in lifestyle, the good food supply (no periods of scarcity) and the overall aging of the population, a strong increase in the incidence of obesity, leading to metabolic derangement has occurred during the last years. These metabolic abnormalities like abdominal obesity, hypertension, hyperlipidemia and impaired glucose tolerance of insulin resistance often tend to cluster together and this combination is called Metabolic Syndrome. The Metabolic Syndrome poses a major risk for further complications, like cardiovascular disease (atherosclerosis) and Type 2 Diabetes, but also complications, like liver disease (non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatic fibrosis), nephropathy, retinopathy and cognitive disorders can occur.

Worldwide obesity has more than doubled since 1980. The most recent numbers of the World Health Organization (WHO) are of 2014, in which more than 1.9 billion adults (18 years and older) were overweight. Of these over 600 million were obese. Forty-one million children under the age of 5 were overweight or obese in 2014. This has all led to a rapid increase in the number of people with associated metabolic diseases or complications. For instance, the number of people with Diabetes has risen from 108 million in 1980 to 422 million in 2014 and an estimated 17.5 million people died from cardiovascular diseases in 2012, representing 31% of all global deaths. (Source: WHO, updated June 2016). These numbers have major implications: An expert panel convened by the National Institutes of Health (NIH) stated that for the first time in history, the steadily improving worldwide life expectancy could level off or even decline as a result of increasing obesity. Also the economic costs are enormous: in the US the medical cost to treat obesity were estimated to be as high as \$147 billion per year (Finkelstein et al., Annual medical spending attributable to obesity: Payer- and service-specific estimates. Health Aff (Millwood) 2009;28:w822-31).

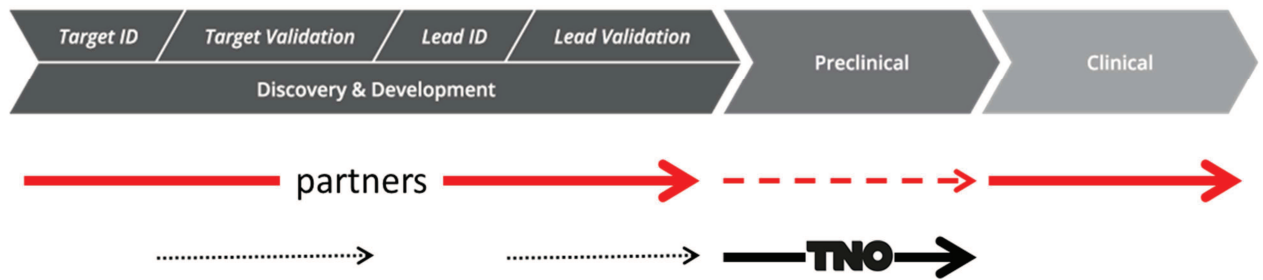
To date, few people succeed in preventing the development of metabolic disorders and their complications by means of an improved lifestyle. Therefore, it is important to promote metabolic health and to develop new prevention and intervention strategies.

Due to the rapidly increasing numbers of people that develop a metabolic disorder, development of novel prevention- and intervention-strategies will have a large social and economic impact. The development of novel insights into the underlying mechanisms involved in metabolic disease development will also have scientific relevance and will contribute to the general knowledge on these metabolic disorders.

3.4 Research strategy

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

The development of new interventions such as nutritions or therapeutics follows a fixed pattern:



First of all, suitable targets will be identified on the basis of, for example, literature, human studies and / or in vitro testing. Subsequently, it will be evaluated whether modification of the target can indeed lead to a change of pathology (for example by in vitro testing, ex vivo tests with human tissue, in vivo testing in transgenic animals). Thereafter, leads will be developed that can affect the target (eg, nutrients, inhibitory antibodies, small molecules, RNA therapy) and those leads will be validated (which substance is most potent, what's the solubility or specificity?). The most promising candidates then enter the preclinical testing phase, which examines whether the candidates are good enough to be tested in humans (clinical phase). The ultimate goal is of course that candidates successfully complete the clinical phase and will be admitted as a new therapy.

TNO as Research and Technology Organization (RTO) supports for years both nutritional or pharmaceutical industry and academic partners in implementing and optimizing preclinical research in the field of cardiovascular and metabolic diseases. The majority of work under this project is in the preclinical phase, but work in the area of target validation (for example, show that a pathway is involved) or lead validation (eg comparing nutrients or different variants of a new compound in order to determine which variant will continue further development) also occurs.

3 R developments in metabolic disorder research: possibilities and limitations

TNO has set up a research program to refine, reduce and replace animal testing. In this program, TNO collaborates with others to accelerate the process of developing better alternatives. TNO is constantly looking for new insights and technologies that can reduce animal experiments. For example, we evaluate drug efficacy with micro-dosing, where a very small dose of the drug is introduced into humans without any risk and measured with our advanced technology. Accelerator Mass Spectrometry (AMS) is used to establish whether the substance has reached the target and if it resides long enough to induce an effect. In addition, we currently focus on designing 'organ-on-a-chip' models. Based on human (stem) cells, we use these models to mimic organ functionality, with organs such as the liver, intestines and lungs. Therewith we want to increase the predictivity and translation of in vitro results to humans. These improved in vitro models provide increasingly better understanding of the underlying mechanisms of metabolic disorders, and reduce the need for animal testing. However, the development of metabolic disorders is a complicated multifactorial process in which multiple organs interact and at present it is not possible to obtain all the knowledge about these complex disorders using only in vitro models. Therefore, we also have a number of highly translational animal models in which we investigate these metabolic disorders.

The current project describes the research that we conduct using these animal models with the aim to 1) either attenuate the development of metabolic disorders or 2) to treat (established) metabolic disorders and their complications, via nutritional or pharmacological interventions. This approach (prevention and treatment) is in line with the present situation in primary care and in hospitals: doctors have to treat patients with different stages of metabolic disease with a combination of lifestyle, nutrition and pharmacotherapy.

The majority (>70%) of the studies that will be conducted in this project will be efficacy studies to evaluate nutritional interventions or new therapeutics. This will take place in conjunction with or on behalf of external partners. For each individual study, the partner(s) will be advised on the optimal study design. Each partner will always be asked what is already known of the compound to be tested, to prevent needless animal use. Furthermore, also aspects such as choosing the most suitable model

(usually depending on the type of metabolic disorder(s) being studied or based on the mechanism of action of the lead), the experimental design, the route of administration, treatment frequency, power analysis, the concentration of choice, the primary and secondary read-out parameters, etc. will be included. If insufficient information is available, it will be decided to first perform a pilot experiment to obtain the desired information (for instance, a dose-finding pilot study could first be performed to find the optimal dose).

The remaining studies that will be carried out under this project application, will be aimed at improvement of the animal models or aim to obtain more knowledge about the models and/or the underlying mechanisms of the different metabolic diseases. Overall we use or develop translational animal models that reflect a certain metabolic disorder. Based on data generated in previous and ongoing studies, available data and information from nutritional or pharmaceutical partners, available literature and interactions with other scientists, we generate an idea on which disease processes are important and should be reflected in the translational models. We perform basic research studies to obtain more knowledge on the metabolic disorders, the disease development and the relevant processes and underlying mechanisms, but also on the models itself and the translational aspects. Ultimately, specific hypothesis regarding intervention in the disease development are evaluated in order to prevent or treat the metabolic disorders or to study the mode of action.

Study specific designs can vary and depend on the stage of the metabolic disease and the type of metabolic disease.

Expectation for the next 5 years:

All studies, animal models, interventions and measurements currently performed are described in this application. New developments in the research field and the focus of companies that develop new compounds or nutrients will strongly affect what kind of studies will be performed the coming years. At this moment, the expectation for the next 5 years is that a significant part of the studies will be NASH studies. Hyperlipidemia and atherosclerosis studies will also remain important. With the new cardiovascular therapies currently under development, it is possible to obtain a further reduction in hyperlipidemia via combination therapy. With this further reduction of hyperlipidemia regression of atherosclerotic plaques might be possible (in addition to further progression). A further shift to combination therapies and regression studies is therefore to be expected. In addition, it is expected that more attention will be paid to diabetic atherosclerosis. In the case of nephropathy, we expect less studies in the coming years: it seems to be difficult to obtain a translational model with similar pathology as observed in humans. For this reason the use of these models to study nephropathy is currently under discussion. Retinopathy is a relatively new field of research within our group, which is still in a somewhat exploratory phase. Depending on the results (development of translational model), we expect this to be a growth area. In addition, the cross-talk between organs (intestine, fat, muscle, brain and liver) and the research on biomarkers is a growing field of research, which we are expected to focus more on in the coming years.

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.

For fundamental research: a metabolic stressor will be applied in a mouse model to induce one or more of the following metabolic disorder(s): **obesity, Type 2 Diabetes, hyperlipidemia, atherosclerosis, NASH, nephropathy and retinopathy**.

For applied or translational research: again a metabolic stressor will be applied in a mouse model to induce one or more of these metabolic disorders, but a preventive or therapeutic intervention will be performed as well. Interventions will usually be nutritional/compound administration (via admix food, admix drinking water, gavages or injections or osmotic minipumps) but can also be other interventions (surgical removal of fat, exercise).

For either fundamental or applied/translational studies, parameters will be measured:

Body weight and food intake will be monitored regularly during the study and blood samples will be taken regularly for measurement of blood glucose, plasma insulin, lipids, inflammation markers etc. At the end of the study animals are sacrificed and blood and tissues are collected for further analyses. More specific parameters can be measured during the study, but depend on the type of metabolic disorder studied and

are mentioned in the appendix.

Metabolic stressors, interventions and parameters to be measured are described in more detail in the appendix.

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.

Different stages of metabolic disorder(s) are being studied, as well as different metabolic disorders/complications: obesity, Type 2 Diabetes, hyperlipidemia, atherosclerosis, NASH, nephropathy and retinopathy. The coherence between the studies is that all studies are related to metabolic disease and contribute to our aim to develop therapeutic strategies to prevent metabolic disorders and their complications. The different metabolic disorders are not separate diseases but are related: the metabolic disorders coincide and the occurrence of one metabolic disorder enhances the risk for others. In addition, similar common pathways play a role in the different metabolic disorders.

One of the most important selection points in our studies, is the choice of animal model to be used. This choice depends very much on the primary and secondary research questions studied, ie. the nature of metabolic disorder endpoint studied and also the stage of the metabolic disorder or complications we would like to evaluate. Since each model has different phenotypic characteristics, the combination of certain characteristics may fit better, dependent on these primary and secondary research questions and the balance of the importance between those research questions. However, additional knowledge on for instance the working mechanism of the compound to be tested can affect the choice of animal model to be used as well. In table 1 the optional animal models are described and in the appendix the optional procedures will be outlined further for the different metabolic disorders and complications.

Table 1. Animal models per metabolic disorder.

Metabolic disorder	Model	Comments
Obesity & Diabetes type 2	C57BL6/j	When put on a high fat diet these mice become obese and insulin resistant.
	Ob/Ob	Leptin deficient mice, develop spontaneously obesity and type 2 diabetes after a short period. Fast and more severe model than diet induced C57BL6/j, but disadvantage is that etiology of type 2 diabetes is not translational to human situation.
	Db/Db	Leptin receptor deficient mice, develop spontaneously obesity and type 2 diabetes after a short period. Disadvantage is that etiology of type 2 diabetes is not translational to human situation. More severe model than ob/ob mice, after 3-4 months drop in insulin and transition to type 1 diabetes model. Only when used in long-lasting studies severe Diabetes with mild-moderate discomfort can occur.
	KKA ^y	Develop type 2 diabetes of polygenic origin. When fed a high fat diet mice become obese and show additional hyperinsulinemia and hyperglycemia. Only when used in long-lasting studies severe Diabetes with mild-moderate discomfort can occur.
Hyperlipidemia & atherosclerosis	ApoE*3Leiden	Mice carrying a human APOE*3Leiden transgene that leads to a defective clearance of triglyceride-rich lipoproteins. While normal wild-type mice have a very rapid clearance of triglyceride rich lipoproteins, ApoE*3Leiden (E3L) mice have an impaired clearance and are thereby mimicking the slow clearance observed in humans. APOE*3-Leiden transgenic mice are highly responsive to fat, sugar and cholesterol feeding with respect to the effects on plasma cholesterol and triglyceride levels. APOE*3Leiden animals have proven to be responsive to the most of the drugs that are also used in the clinic, and therefore extremely suitable in combination / comparison studies. The animals also respond to lifestyle interventions, dietary supplements, anti-oxidants, omega-3 PUFAs, hormones and pre / probiotics. Males and females can be used for studies of lipids, only females are suitable for

		atherosclerosis research. Male mice do not/hardly develop atherosclerosis but do in turn develop insulin resistance and liver disease (NAFLD).
	ApoE*3Leiden.CETP	In contrast to humans, wild type mice express no CETP (which transfers cholesterol from HDL to (V)LDL). The double transgenic ApoE3*Leiden.CETP mouse brings CETP to expression and therefore this model is translational to the human situation regarding HDL metabolism. Furthermore, this mouse has the same characteristics as the APOE*3Leiden mouse regarding its (V)LDL metabolism.
	ApoE*3Leiden.GK+/-	Cross-breeding of ApoE*3Leiden with GK+/- mouse (diabetic model due to the diminished expression of glucokinase enzyme). This particular model combines the dyslipidemic phenotype of ApoE*3Leiden mouse with diabetic phenotype of GK mouse and this model can therefore be used to study diabetic hyperlipidemia or diabetic atherosclerosis.
	LDLR-/- and LDLR-/-Leiden	The mice lack a specific receptor (Ldlr) and reflect a particular group of patients that have the same genetic impairment (patients with defective or absent Ldlr). Both males and females can be used for lipids and atherosclerosis research. LDLR-/-Leiden mice are an established substrain of LDLR-/- mice that are susceptible to become obese on energy dense diets and that activate proinflammatory and profibrotic pathways in response to diets with human-like composition of macronutrients.
	ApoE-/-	The mice lack apolipoprotein E. Both males and females can be used for lipid and atherosclerosis research. This is a more severe model than all the above models, with higher lipid levels and more atherosclerosis.
NASH	ApoE*3Leiden and ApoE*3Leiden.CETP	Mice that have a human-like lipoprotein metabolism (see also comments above) and when put on a high fat and high cholesterol diet these mice develop obesity, dyslipidemia, mild insulin resistance and several characteristics of NASH (steatosis, inflammation and hepatic fibrosis). The underlying mechanism of NASH induction probably involves the formation of hepatic cholesterol crystals, leading to hepatic inflammation and lipotoxicity. At this moment, we know that male mice develop NASH and fibrosis when put on the high fat and cholesterol diet. Male mice are more susceptible to become obese in response to high caloric diets and accumulate fat in the abdominal cavity (essentially as it is also the case in humans with metabolic disease). For ApoE*3Leiden.CETP mice we are currently evaluating whether the female mice also develop NASH and fibrosis (<i>in vivo</i> studies ongoing). Depending on the outcome, female mice might be used as well.
	LDLR-/-Leiden	Ldlr deficient mice (see also comments above) that develop hyperlipidemia when treated with all sorts of high caloric diets. These mice develop pronounced obesity and insulin resistance and several characteristics of NASH (steatosis, inflammation and hepatic fibrosis). The underlying mechanism of NASH induction differs as compared to ApoE*3Leiden(.CETP) mice: in both models the increase in white adipose tissue is thought to be involved, but in the LDLR-/-Leiden mice this mechanism plays a more prominent role. At this moment, we know that male mice develop NASH and fibrosis when put on the high caloric diets. Male mice are more susceptible to become obese in response to high caloric diets and accumulate fat in the abdominal cavity (essentially as it is also the case in humans with metabolic disease). For LDLR-/-Leiden mice we are currently

		evaluating whether the female mice also develop NASH and fibrosis (<i>in vivo</i> studies ongoing). Depending on the outcome, female mice might be used as well.
Nephropathy	Ob/Ob	Obese and insulin resistant/diabetic mice (see also comments above) that can also be used for nephropathy studies.
	Db/Db	Obese and insulin resistant/diabetic mice (see also comments above) that can also be used for nephropathy studies. Only when used in long-lasting studies severe Diabetes with mild-moderate discomfort can occur.
	KKA ^y	Obese and insulin resistant/diabetic mice (see also comments above) that can also be used for nephropathy studies. Only when used in long-lasting studies severe Diabetes with mild-moderate discomfort can occur.
Retinopathy	ApoE*3Leiden and ApoE*3Leiden.CETP	Mice that have a human-like lipoprotein metabolism (see also comments above) and when put on a high fat diet these mice also develop retinopathy.
	LDLR-/-Leiden	Ldlr deficient mice (see also comments above) and when put on a high fat diet these mice also develop retinopathy.

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	Metabolic disorder(s) study
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	50100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	The Netherlands Organisation for Applied Scientific Research (TNO)	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		3.4.4.1	Metabolic disorder(s) study

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.

The different metabolic disorders are not separate diseases but are related: the metabolic disorders coincide and the occurrence of one metabolic disorder enhances the risk for others. In addition, similar common pathways play a role in the different metabolic disorders. To study these metabolic disorders, we use a whole set of different mouse models that for instance differ in which aspect of the metabolic disorders is most prominently present (see also paragraph B). The general design of metabolic disorder studies is a prolonged treatment of mice to a high caloric diet in order to induce metabolic disorder(s). The detailed study design being used depends on specific metabolic disorder(s) under investigation: **obesity, Type 2 Diabetes, hyperlipidemia, atherosclerosis**, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) progressing towards non-alcoholic steatohepatitis (**NASH**), as well as **nephropathy** or **retinopathy** will be studied (the exception to studies with induction of the metabolic disorder via a high caloric diet, is when ob/ob or db/db mice are used (obesity or diabetes studies); These genetically modified models are already obese and insulin resistance and do not require induction via a high fat diet).

The specific diet being used will depend on the research question(s) to be studied in order to induce metabolic disorder(s): high fat diet for induction of obesity, NASH, nephropathy or retinopathy; high cholesterol diet to induce hyperlipidemia/atherosclerosis or a high fat and cholesterol diet to induce NASH. The study duration and subsequently the length of the study ranges from approx. 4-40 weeks and will depend on the diet being used, the sensitivity of a mouse strain towards this diet, and stage of metabolic disorder development under investigation (as an example: in ApoE*3Leiden.CETP mice NAFLD develops from simple liver steatosis at 4-6 weeks after dietary intervention to steatosis with hepatic inflammation/NASH (around 10 weeks) to NASH with early (around 15 weeks) and subsequently advanced fibrosis (at 25 weeks); the study duration will then be dependent on the stage to be investigated and

mouse strain and diet being used).

Importantly, the specific combination of animal model + diet (e.g. the type of fat) determines which characteristics of metabolic disease will predominantly be induced and via which pathways the metabolic disorder(s) will be evoked.

A study can include the following groups:

1. Negative control group (metabolic disorder is induced, but no intervention).

Also an additional negative control group can be added that reflects the metabolic disease stage at the start of the treatment (if intervention starts after metabolic disorder(s) have been established it might be needed to add this additional control group. The additional control group then allows discrimination between: 1) whether the treatment can stop further progression of the disease development or 2) whether the treatment leads to reversal of metabolic disorder).

2. Positive control group or reference group (metabolic disorder is induced, but also intervention with known beneficial (positive control) or well-established effect (reference control) on the metabolic disorder).

3. Intervention groups (metabolic disorder is induced and interventions to be evaluated are applied) Interventions may be given as prevention design (administration simultaneously with disease induction) or as treatment design (administration after metabolic disorder has been established) and may be directed to the early phase of metabolic disorder development, the later established phase of metabolic disorder development or the advanced stage. This will also determine the timing and duration of the interventions to be applied.

4. Healthy reference group (no induction of metabolic disorder: mice on control diet: low fat or chow diet)

Additional groups can be added as well: additional groups for PK (pharmaco-kinetic) analysis could be added if an additional research question is also to obtain more PK information on the administered compounds.

Furthermore, it can also be decided to first perform a pilot experiment if crucial information is lacking (for example, first a dose-finding pilot study could be performed to find the optimal dose).

Besides directly testing the efficacy of different prevention- or intervention-therapies (e.g. by lifestyle, nutrition and pharmaceuticals), also more basic research studies are performed aiming at understanding the sequence of events or underlying mechanisms of the disease development. For understanding the development of metabolic disorders, time-course studies might be performed in which groups of animals are compared after a different time period of diet administration (for instance to unravel whether metabolic dysfunction of one organ precedes metabolic dysfunction of another organ).

Also animal studies can be performed aiming at developing a novel model or to improve existing models. For all studies, it is very important that we use translational models that reflect the metabolic disorder(s) in humans as much as possible. We are continuously improving our in vivo models, and perform comparative studies using human organ tissues and human-based plasma readouts (e.g. same biomarkers). An improvement of the model could be for instance a) an adaptation of the diet being used to induce the metabolic disorder, or b) use of a more translational mouse strain.

The primary outcome parameters will depend on the specific research question:

- For **obesity** studies primary outcome parameters will be body composition (body weight and fat mass)
- For **Diabetes** studies, the primary outcome parameters will be insulin resistance, measured via blood glucose/plasma insulin levels, oral glucose tolerance or insulin tolerance tests or hyperinsulinemic euglycemic clamps.
- For **lipid** studies, the primary outcome parameters will be plasma lipids.
- For **atherosclerosis** studies the primary outcome parameters will be histological analysis of plaque size and severity in aortic root area or aorta.
- For **NASH** studies the primary outcome parameters will be the histological analysis of NASH and fibrosis, similarly as is currently done in human patients to diagnose NASH. Also biochemical measurements of liver lipids or collagen can be added.
- For **nephropathy** studies the primary outcome parameters will be histological analysis of kidneys, as well as kidney function measured by creatinine/albumin ratio in urine or glomerular filtration rate.
- For **retinopathy** studies the primary outcome parameters will be the measurement of structural

changes of the retina for instance with a retinal imaging camera.

In general, body weight and food intake will be monitored and blood/plasma measurements will be performed to analyse risk factors for the metabolic disorder. At the end of each study, tissues will be collected for analysis of primary outcome parameters. Typically, histopathological analysis of tissues other than mentioned in the list of primary outcome parameters such as gut and adipose tissue (as secondary endpoint) can be performed as well because they constitute key drivers of the primary endpoint and are investigated as secondary research question.

(Remark: It is an intrinsic feature of metabolic dysfunction that several organs become diseased, often requiring the analysis of a primary endpoint in context of a secondary endpoint.)

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

As mentioned above, the precise study design depends on the primary and secondary research question and type of metabolic disorder (or combinations thereof) being studied. In most (<95%) of our studies metabolic disorder is induced via diet manipulations. The exception is when ob/ob or db/db mice are used (obesity or diabetes studies). These genetically modified models are already obese and insulin resistance and do not require induction via a high fat diet.

During every study body weight and food intake are monitored regularly, different blood samples will be taken and at the end mice will be sacrificed and tissues will be collected. Depending on the research questions, additional procedures, either for induction of metabolic disorder or for measurement of additional parameters could be added to the study. These additional procedures are described below for the different metabolic disorders.

For all metabolic disease studies applies that interventions can be performed in a prevention design (simultaneously with induction of disease) or as treatment design (after disease induction). There are different possibilities for administration routes of compounds:

- Oral administration via diet admix or via drinking water
- Oral administration (p.o.) by gavage
- Intraperitoneal injection (i.p.)
- Subcutaneous injection (s.c.)
- Intravenous injection (i.v.)
- Intramuscular injection (i.m.)
- Via osmotic mini-pump (s.c.): Using appropriate anesthesia and analgesia, osmotic minipumps suitable for mice will be placed subcutaneously. During an experiment, it might be necessary to replace the minipump. Maximal 4 minipumps will be placed sequentially.

Maximum volume / frequency to be used are according to what is considered good practice (Diehl *et al.*, J Appl Toxicol. 2001 Jan-Feb; 21(1):15-23).

In addition to an intervention with diets, nutrients or pharmaceutical drugs, lifestyle interventions (e.g. exercise via running wheel) can be performed (alone or in combination), essentially as it is common practice for patients with metabolic disease.

During the study mice will be checked daily and body weight and food intake will be monitored regularly by weighing the mice individually and weighing food per cage.

During the study at several time-points blood samples will be taken to measure risk factors for the metabolic disease being studied. Blood samples can be taken:

- via tail vein after 4-5 hours fasting
- via tail vein after overnight fasting (in particular cases it may be necessary to collect blood after prolonged fasting, e.g. when ketone bodies or free fatty acids or other markers of fasting are measured or if we need blood samples that do not contain chylomicrons or any food derived markers).
- via tail vein non-fasted (in particular cases it may be necessary to collect non-fasted blood, e.g. after postprandial challenge tests after meal or to assess intestinal absorption of a food component, metabolite, gut integrity marker or nutrient).

Maximum volume / frequency to be used are according to what is considered good practice (Diehl *et al.*, 2001).

At the end of the experiment mice will be euthanized, and plasma and different tissues will be collected.

During the study the following additional induction or intervention procedures could be added:

Obesity studies

Fat removal or transplantation (to study the fat-fat or fat-other organ interaction)

To gain more insight into the metabolic function of the different fat depots and the disease-promoting effect of inflamed adipose tissue on other metabolic disorders (e.g. NAFLD development), it is possible that in some (fundamental) studies we would like to transplant white or brown fat from one mouse to another or remove a specific fat depot (mimicking liposuction of excess fat in humans). Appropriate anesthesia and analgesia will be used.

Generic fat loss/redirection to healthy weight

A generic loss of adipose tissue mass (unspecific and not limited to a particular depot) can be achieved with restricted or alternate diet feeding (switch from high fat diet to chow/low fat diet). This type of dietary challenge is a specific form of lifestyle intervention and advised to patients suffering from metabolic disease. It may be applicable in some of the studies, alone or in combination with other therapies (nutritional and pharmaceutical). Generic weight loss may also be achieved with voluntary exercise (e.g. running wheels) as it is commonly advised in humans to strengthen muscles and burn excess energy/calories through intensified movement. In some of our studies these generic lifestyle interventions for metabolic disease will be employed and the calories burnt will be determined (e.g. via indirect calorimetry, analysis of the resultant of exercise (e.g. muscle strength)).

Lipid and atherosclerosis studies

Drinking water interventions

- Fructose in drinking water and other fructose-containing liquids stimulate VLDL production, which will result in a more atherogenic lipoprotein profile

Nephropathy studies

Drinking water interventions

- Blood pressure increases by administering a vasoconstrictor in drinking water. L-NAME and L-NNA (N(G)-nitro-L-arginine methyl ester) are NOS inhibitors that increases the blood pressure. Nitric oxide (NO) is a gas molecule which plays an important messenger role in various biological processes. In blood vessels NO relaxes the smooth muscle cells which results in vasodilatation and in this way, it can reduce blood pressure. NO can be made from endogenous L-arginine and oxygen by means of various nitric oxide synthase (NOS) enzymes.

Partial nephrectomy (to augment nephropathy in the remaining kidney)

With respect to kidney function, all organisms have an overcapacity and one kidney is typically sufficient to maintain metabolic health (therefore it is allowed to donate one kidney to a patient). To augment the development of metabolic kidney disease and induction of e.g. diabetic nephropathy in the remaining kidney, in some nephropathy studies, renal mass will be removed during the experiment. Appropriate anesthesia and analgesia will be used.

Furthermore, during the study additional parameters could be measured. Depending on the metabolic disorder being studied and the research question, a combination of parameters will be chosen that best answers the research question. During the study the following procedures could be added for measurement of additional parameters:

Obesity studies

Feces collection (for measurements of metabolites, proteins, for example, to be able to make an energy balance or microbiota analysis)

- By collecting feces after several days from the cage bed (on group level) or after lifting mice (individual feces collection)

- By taking rectal swabs

Non-invasive imaging measurements

- Body composition (fat, water and lean body mass) can be measured via placement in Echo MRI (about 1-3 minutes) without anesthesia.
- Other imaging methods relevant for metabolic disease assessment such as (f)MRI and fluorescence imaging for instance could be used for more precise measurement of abdominal fat, ectopic fat or detection of metabolic disease-related morphological changes, by imaging of reflected light or changes of electromagnetic fields under appropriate anesthesia.
- Indirect calorimetry using the TSE system. The mice are temporarily housed individually (max. one week) in sealed cages, which are comparable in terms of bedding and size with the normal housing cages. There is a constant air flow through the cage. The air goes into the cage and the air cage again is measured by VO_2 and VCO_2 . From this the energy consumption and the oxidation of the substrate can be measured as a measure of metabolic performance. In addition, the continuous activity is measured by infra-red light streams around the cage.

Challenge measurement (to measure metabolic resilience after application of acute metabolic stressor)

- Administration of inflammatory (e.g., bolus of interleukin; i.p. or s.c. or orally) or dietary challenge (bolus of dietary fat, lipids, carbohydrates, dextran, cholesterol) to assess the metabolic or inflammatory response after set time points.
- Challenges to measure gut permeability (with administration of FITC-dextran, 14C-PEG200 or heat-inactivated bacteria).

Blood samples can be taken before, during and after the challenge (one or more blood samples, depending on the specific research question).

Grip strength and inverted screen test (to measure muscle strength)

Grip strength will be determined by placing mice with two or four limbs on a grid attached to a force gauge and steadily pulling the mice by their tails. Grip strength is defined as the maximum strength produced by the mouse before releasing the grid. On each occasion five trials will be performed for each mouse with a 1-minute resting period between the trials.

Inverted screen test will be performed by placing the mouse in the center of a wire mesh screen and then rotating the screen to an inverted position within 2 seconds. The time when the mouse lets go of the grid is noted or the mouse is removed when the criterion time of 60 seconds is reached. If a mouse lets go of the grid within 10 seconds, another trial will be performed with a maximum of three trials.

Diabetes studies

Glucose tolerance test (indicative measurement of insulin sensitivity)

After 4-5 hours or overnight fasting a first blood sample is taken via tail vein (t=0 minutes). Thereafter, the glucose tolerance test will be started. For this purpose, the mice receive a glucose bolus (2 g / kg via oral gavage or via ip injection), after which small blood samples will be taken after 5, 15, 30, 45, 60 and 120 minutes for the measurement of blood glucose (and optional plasma insulin). As compared to the hyperinsulinemic euglycemic clamp this method is less accurate, but easier and not lethal.

Insulin tolerance test (measurement of insulin clearance)

After 4-5 hours or overnight fasting a first blood sample is taken via tail vein (t=0 minutes). Thereafter, the insulin tolerance test will be started. For this purpose, the mice receive an insulin bolus (0.75-1U / kg g / kg, via ip injection), after which small blood samples will be taken after 15, 30, 60 and 120 minutes for the measurement of plasma insulin (and optional blood/plasma glucose).

Hyperinsulinemic euglycemic clamp (measurement of insulin sensitivity; non-recovery)

Mice are fasted overnight, and then anesthetized with appropriate injection anesthesia. During this clamp procedure insulin will be administered via a primed continuous intravenous infusion for 2 to 3 hours to attain steady-state circulating insulin levels. A variable glucose infusion will also be started and adjusted to maintain euglycemia, measured at 10-minutes intervals via tail bleeding. Both hepatic and peripheral insulin sensitivity as well as tissue-specific insulin sensitivity (in heart, fat, and muscle) can be

determined (using a 3 H-glucose label to measure peripheral and hepatic insulin resistance, and in addition, 14 C-deoxyglucose label for assessment of tissue-specific insulin resistance). Blood samples will be taken during the procedure and at the end mice will be sacrificed via cervical dislocation and heart puncture will be performed and tissues will be collected.

Hyperglycemic clamp (measurement of insulin secretion; non-recovery)

Mice are fasted overnight, and then anesthetized with appropriate injection anesthesia. During this clamp procedure glucose will be administered via a primed continuous intravenous infusion for 2 to 3 hours to attain hyperglycemia. Blood samples will be taken after 0, 2, 5, 10, 15, 40, 50 and 60 minutes for measurement of plasma insulin and at the end mice will be sacrificed via cervical dislocation and heart puncture will be performed and tissues will be collected.

Lipid and atherosclerosis studies

Deuterated water administration (D₂O)

To be able to trace newly formed proteins (lipids for instance) within a given period, D₂O can be given for a short period (number of days) or long (several weeks) period in our studies. Labeling can take place at various times of the study and depends on the specific question. D₂O will be built into all the newly synthesized proteins and in this way newly formed protein can be traced. On first day, the mice receive a single i.p. injection with body warm D₂O 100% / 0.9% NaCl to label the body water around 2-5% of the mouse. Then the D₂O body water levels will be maintained by adding D₂O in the drinking water (containing 4-8% D₂O) until sacrifice.

Feces collection (for measurements of fatty acids, sterols, for example, to be able to make an energy balance or microbiota analysis)

- By collecting feces after several days from the cage bed (on group level) or after lifting mice (individual feces collection)
- By taking rectal swabs

VLDL production (measurement of VLDL production; non-recovery)

Mice are fasted for 4 hours, and then anesthetized with appropriate injection anesthesia. Under anesthesia Tran 35S-label is injected intravenously in the tail for measurement of the apoB novo synthesis and 30 minutes thereafter the mice are injected with Triton WR 1339 (iv, tail) for complete blocking of VLDL clearance. 0, 15, 30, 60 and 90 minutes after Triton injection, a blood sample (40 µl) is taken via the tail for measurement of plasma triglycerides (VLDL production measurement). After 90 minutes, the mice are sacrificed via cervical dislocation and the remaining blood is collected via cardiac puncture for VLDL isolation and determination of the ApoB novo synthesis and lipid composition VLDL. Different tissues can be isolated as well.

VLDL clearance (measurement of VLDL clearance; non-recovery)

For this purpose, mice are anesthetized intraperitoneally with appropriate injection anesthesia. Mice will receive VLDL-like particles labeled with 3 H-triolein and 14C-cholesteryl oleate via an injection into the tail. After 2, 5, 10 and 15 minutes, a blood sample is taken via the tail (40 µl per time point). The mice are sacrificed by cervical dislocation and blood is collected at the end of the experiment by means of a heart puncture and different tissues are isolated as well. 3H and 14C activity is measured in tissues and plasma samples.

Blood pressure measurement

Carried out using non-invasive tail cuff measurement, in a restrainer without anesthesia.

Gall bladder cannulation (to measure bile production; non-recovery).

This experiment is carried out under appropriate anesthesia and implies that the gall bladder is cannulated, then every 15 minutes bile is collected for 1 hour (4 time points). At the end of the experiment mice are euthanized by means of cervical dislocation, followed by section and tissue removal.

Challenge measurement (to measure metabolic resilience after application of acute metabolic stressor)

- Administration of dietary challenge (bolus of dietary fat, lipids, bile acids, fatty acids, cholesterol) to assess the metabolic response after set time points.
- Challenges to measure gut permeability (with administration of FITC-dextran, 14C-PEG200 or heat-inactivated bacteria).
- Challenges with heparin administration for determination of lipoprotein lipase (LPL) activity
- Challenges using injection of thioglycolate (1 mL, 3% thioglycolate i.p.) for the isolation of peritoneal macrophages. This creates an inflammatory response. After 4 days, the mice are sacrificed by CO₂ inhalation and the macrophage will be isolated by peritoneal lavage. Blood samples can be taken before, during and after the challenge (one or more blood samples, depending on the specific research question).

NASH studies

Deuterated water administration (D₂O)

To be able to trace newly formed proteins (hepatic collagen for instance) within a given period, D₂O can be given for a short period (number of days) or long (several weeks) period in our studies. Labeling can take place at various times of the study and depends on the specific question. D₂O will be built into all the newly synthesized proteins and in this way newly formed protein can be traced. On first day, the mice receive a single i.p. injection with body warm D₂O 100% / 0.9% NaCl to label the body water around 2-5% of the mouse. Then the D₂O body water levels will be maintained by adding D₂O in the drinking water (containing 4-8% D₂O) until sacrifice.

Non-invasive imaging measurements

- Body composition (fat, water and lean body mass) can be measured via placement in Echo MRI (about 1-3 minutes) without anesthesia.
- Other non-invasive imaging methods relevant for metabolic disease assessment such as (f)MRI, FibroScan and fluorescence imaging for instance could be used for more precise measurement of hepatic fat or fibrosis or detection of metabolic disease-related morphological changes for example by imaging of reflected light or changes of electromagnetic fields under appropriate anesthesia.

Removal of a liver lobe or liver biopsy (for interim NASH and fibrosis measurement)

In clinical settings, liver biopsies are taken to diagnose liver disease such as NAFLD and to estimate the efficacy of a treatment. To mimic the situation in patients, the NASH development over time during the experiment within one animal is measured in some studies. Appropriate anesthesia and analgesia will be used and one liver lobe will be ligated and removed or a small liver biopsy will be taken.

Challenge measurement (to measure metabolic resilience after application of acute metabolic stressor)

- Administration of inflammatory (e.g., bolus of interleukin; i.p. or s.c. or orally) or dietary challenge (bolus of dietary fat, lipids, bile acids, fatty acids, carbohydrates, dextran, cholesterol) to assess the metabolic or inflammatory response after set time points.
- Challenges to measure gut permeability (with administration of FITC-dextran, 14C-PEG200 or heat-inactivated bacteria).

Blood samples can be taken before, during and after the challenge (one or more blood samples, depending on the specific research question).

Nephropathy studies

Urine sampling (for measurements of proteins and metabolites)

- Spontaneous excretion caused by lifting the mouse and collection of urine. If the mouse does not lose urine spontaneously, light bladder massage can be applied.
- Urine sampling overnight (for detailed measurement of excretion of proteins and metabolites). Mice will be housed individually in an excretion collection cage overnight (16 hours). Urine and feces can be sampled.

Glomerular filtration rate (=GFR) measurement

As a measure for kidney function/microvascular function by determining the rate of loss and re-absorbance of vital factors such as protein and carbohydrates. This is the golden standard measurement for kidney function. This can be done in 2 different ways:

- 1) Via iv bolus injection of 5% FITC-inulin, followed by small blood samples via tail cut after 3, 7, 10, 15, 35, 55 and 75 minutes to measure clearance of 5% FITC-inulin.
- 2) Via an osmotic minipump. Blood samples will be collected at start and end of the pumping period. In between, urine will be sampled.

Non-invasive imaging measurements

- Non-invasive imaging methods relevant for metabolic disease assessment such as (f)MRI and fluorescence imaging for instance could be used for more precise measurement of blood vessel function or detection of metabolic disease-related morphological changes for example by imaging of reflected light or changes of electromagnetic fields under appropriate anesthesia.
- Blood pressure measurement using non-invasive tail cuff measurement, in a restrainer without anesthesia.

Retinopathy studies

Non-invasive imaging measurements

- Other non-invasive imaging methods relevant for metabolic disease assessment such as (f)MRI, Raman and fluorescence imaging for instance could be used for more precise measurement of blood vessel function, detection of metabolic disease-related morphological changes, retinopathy for example by imaging of reflected light or changes of electromagnetic fields under appropriate anesthesia.

If the research question of the study extends beyond one metabolic disorder and is also a combination of one of the above mentioned metabolic disorders, also a merged study design could be used and a combination of procedures described, dedicated to a specific metabolic disorder in this appendix could be combined. However, the number of different procedures in total will be considered and the cumulative discomfort will not exceed above moderate.

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or years of experience with similar type of experiments or if unknown from pilot studies) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually between 0.8-0.9) with appropriate statistical tests like the t-test with a $p < 0.05$. As an indication: usually $n=8$ mice will be used for lipid studies, $n=12$ mice per group for obesity, Diabetes and nephropathy studies and $n=15$ mice per groups for NASH, atherosclerosis and retinopathy studies, based on variation in the respective primary outcome parameters.

In addition, there could be low-responders / outliers. For ApoE*3Leiden and ApoE*3Leiden.CETP mice it is well known that a certain percentage of the mice does not respond to a cholesterol containing diet with respect to the development of hyperlipidemia. For lipid and atherosclerosis studies, these mice will be excluded in the beginning of the study to reduce the variation and thus the number of animals required per group. Although for NASH parameters it is not very clear yet to predict which mice develop NASH or not, recent data has suggested that mice (both ApoE*3Leiden.CETP mice as well as LDLR-/-Leiden mice) with relatively low blood glucose levels at the start of the study have a higher propensity to develop extremely high levels of hepatic fibrosis after several weeks on certain diets. In future NASH studies, we might decide to exclude these mice in the beginning of the study, to achieve a more homogenous induction of fibrosis. For diabetes studies using ob/ob, db/db or KKA^Y mice, outliers with respect to glucose and insulin levels can be excluded at the beginning of the study to start the treatment with more homogenous groups.

If possible different study groups will be combined, so that different treatment groups can share the same control groups.

Several research questions focus on therapeutic interventions in animal model where metabolic diseases and its complications have been established. To this end mice have to be put on the high caloric diets first to induce the metabolic disease. Mice are not useful anymore in starting new studies from the age of

22 weeks. To reduce breeding surplus and extend the usability of our mice, several cohorts of the mouse strains we breed ourselves (ApoE*3Leiden(.CETP) or LDLR-/-Leiden mice) will be put on a high caloric diet (e.g. high fat or high fat with cholesterol diet) without yet being assigned to a definite study protocol. In this way, the usability of these mice is extended because these mice can be used in yet to be agreed future studies that require a run-in period on a high fat or high fat and cholesterol diet. This will extend the period that mice can be assigned to studies well beyond the age of 22 weeks.

During this period of high fat or high fat and cholesterol diet, 2-3 times a blood sample can be taken for the measurement of cholesterol, triglycerides, glucose, insulin, or other parameters. At t=0 for baseline and 1-2 additional time points to monitor in-life the development of metabolic disease and to eliminate non-responders to diet or biological outliers (to homogenize the study population). This possibility is described in our breeding policy to ensure optimal breeding and use of animals and reduction of surplus animals.

B. The animals

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

Mice, ApoE*3Leiden, ApoE*3Leiden.CETP mice or LDLR-/-Leiden mice from our own breeding facility, 8-22 weeks old will be used. In addition, C57BL6/J wild-type mice, ob/ob, db/db, KKA^y, ApoE-/-, LDLR-/- mice obtained from commercial breeders, 8-22 weeks old can be used.

Obesity studies & **Diabetes** studies: C57BL6/J mice can be used, when put on a high fat diet these mice become obese and insulin resistant. In addition, ob/ob, db/db, KKA^y mice can be used. The latter genetic models are all obese and insulin resistant/diabetic mice and can also be used without additional induction of high fat diet.

For **lipid** studies & **atherosclerosis** studies the following mice can be used:

*ApoE*3Leiden*: Mice carrying a human APOE*3Leiden transgene that leads to a defective clearance of triglyceride-rich lipoproteins. While normal wild-type mice have a very rapid clearance of triglyceride rich lipoproteins, ApoE*3Leiden (E3L) mice have an impaired clearance and are thereby mimicking the slow clearance observed in humans. APOE*3-Leiden transgenic mice are highly responsive to fat, sugar and cholesterol feeding with respect to the effects on plasma cholesterol and triglyceride levels. APOE*3Leiden animals have proven to be responsive to the most of the drugs that are also used in the clinic, and therefore extremely suitable in combination / comparison studies. The animals also respond to lifestyle interventions, dietary supplements, anti-oxidants, omega-3 PUFAs, hormones and pre / probiotics. Males and females can be used for studies of lipids, only females are suitable for atherosclerosis research. Male mice do not/hardly develop atherosclerosis but do in turn develop insulin resistance and liver disease (NAFLD).

*APOE*3Leiden.CETP*: In contrast to humans, wild type mice express no CETP (which transfers cholesterol from HDL to (V)LDL). The double transgenic ApoE3*Leiden.CETP mouse brings CETP to expression and therefore this model is translational to the human situation regarding HDL metabolism. Furthermore, this mouse has the same characteristics as the APOE*3Leiden mouse regarding its (V)LDL metabolism.

LDLR-/- and LDLR-/-Leiden mice: both males and females can be used for lipids and atherosclerosis research. The mice lack a specific receptor (Ldlr) and reflect a particular group of patients that have the same genetic impairment (patients with defective or absent Ldlr). LDLR-/-Leiden mice are an established substrain of LDLR-/- mice that are susceptible to become obese on energy dense diets and that activate proinflammatory and profibrotic pathways in response to diets with human-like composition of macronutrients.

ApoE-/-mice: both males and females can be used for lipid and atherosclerosis research. This is a more severe model than all the above models, with higher lipid levels and more atherosclerosis.

For **NASH** studies the following mice can be used:

Mice, ApoE*3Leiden with or without CETP (ApoE*3Leiden.CETP) mice or LDLR-/-Leiden mice, from our own breeding facility, 8-22 weeks old.

*ApoE*3Leiden(.CETP) mice* are mice that have a human-like lipoprotein metabolism and when put on a high fat and high cholesterol diet these mice develop obesity, dyslipidemia, mild insulin resistance and several characteristics of NASH (steatosis, inflammation and hepatic fibrosis).

LDLR^{-/-}.Leiden mice develop hyperlipidemia when treated with all sorts of high caloric diets. These mice develop pronounced obesity and insulin resistance and several characteristics of NASH (steatosis, inflammation and hepatic fibrosis).

Both models develop diet-induced NASH, but the underlying mechanisms differ: in ApoE*3Leiden(.CETP) mice hepatic cholesterol crystals are being formed, leading to hepatic inflammation and lipotoxicity, which probably plays a role in the NASH induction. In both models the increase in white adipose tissue is thought to be involved in the NASH induction, but in the *LDLR*^{-/-}.Leiden mice this mechanism plays a more prominent role.

At this moment, we know for all our strains of mice that male mice develop NASH and fibrosis when put on the high fat or high fat and cholesterol diet. Male mice are more susceptible to become obese in response to high caloric diets and accumulate fat in the abdominal cavity (essentially as it is also the case in humans with metabolic disease). For ApoE*3Leiden.CETP and *LDLR*^{-/-}.Leiden mice we are currently evaluating whether the female mice also develop NASH and fibrosis (*in vivo* studies ongoing). Depending on the outcome, female mice might be used as well.

Nephropathy studies: ob/ob, db/db, KKA^y mice are all obese and insulin resistant/diabetic mice and will be used for nephropathy studies.

Retinopathy studies: ApoE*3Leiden(.CETP) mice and *LDLR*^{-/-} mice on a high fat diet develop retinopathy and will therefore be used for retinopathy studies.

The required number of mice will be estimated to be 10.000 for a period of 5 years. This is based on an expected number of metabolic disorder studies of approx. 25 per year (based on historical data of last 2 years). The average study will consist of 5-6 groups of 12-15 mice each, so on average 80 mice per study. This leads to a required total number of 10.000 mice (25 studies x 80 animals / study x 5 years).

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: We continuously seek to replace animal studies with other methods, preferably using human tissue or cells. For example, we validate our animal pathology and molecular observations in human biopsy material (e.g. liver, adipose tissue, muscle tissue but also human plasma and microbiota). However, fresh human tissue is scarce and often not fresh enough to quantify sensitive molecules with rapid turn-over or short half-life such as mRNAs, cytokines and hormones, bioactive lipids (see also Vital tissue whitepaper:

<http://mailing.tno.nl/ct/m8/k1/IG9BLvQKYu1MheK9DpQtFAFy3yeEoutjgEr6Gj5ucJVVT1LUJXPZ6kSA7n8Q0sK4vv7T0WuHMUTxdHEBnJhNg/ZD8yND3CLIt58HW>). We work with human cell and *in silico* models, where possible, since that helps us to make better predictions about how a substance, for example a drug, will affect humans. When we have discovered ways to replace animal testing, we use them ourselves and encourage others to apply these alternative tests. Non-testing techniques, such as computer modelling, are continually being developed and improved.

Before we consider to perform a novel metabolic disease study, we will first analyse appropriate cell lines, existing patient materials or materials available from previous animal studies, which contributes to

a reduction of animal numbers. The use of human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the animal numbers to a minimum.

However, animal studies are currently unavoidable to study the complex organ-organ interactions that are intrinsic to all metabolic diseases and the resulting metabolic disease complications (for example cardiovascular or hepatic endpoints). TNO has launched a program Organ-on-a-Chip (see also Organ-on-a-Chip whitepaper: <http://publications.tno.nl/publication/34622299/rkPoAJ/grootaers-2016-three.pdf>) that aims at mimicking organs and combining them via a fluidic system and we are involved as partner in many international consortia. These tools do currently not mimic the organ-organ interactions and the elementary features of metabolic disease (e.g. ectopic fat accumulation, vascular dysfunction) and are still in their infancy. The development of metabolic diseases is a too complicated multifactorial process in which multiple organs interact in an orchestrated way (gut, liver, adipose tissue, muscle, vascular system) to provide energy from food and distribute it to the other organs. Another layer of complexity is the involvement of multiple different cell types (e.g. immune cells) most of which cannot be cultured in vitro without activating them. Hence, given the complexity of the glucose and lipid metabolism and metabolic health in general, the effect of compounds or nutritional interventions on metabolism can be examined only in intact animal models with intact vascular system and there are currently no established alternative methods to investigate these metabolic processes.

Reduction: TNO aims to reduce the number of animals involved in testing. We regularly review our testing methods and implement integrated testing strategies. This helps us to determine whether animal testing is needed or whether the same information can be obtained in other ways. Data simulations are performed to determine the optimal study design that will provide the most valuable information with the smallest number of animals in each experiment. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible. Experiments will be done sequentially, where on basis of the results, decisions will be taken for the next steps. If possible different study groups from different studies will be combined, so that they can share the same control groups.

Refinement: We continuously aim to develop, validate and adapt (preferentially non-invasive) test methods in such a way that the test animals are exposed to as little discomfort and stress as possible (e.g. use of echoMRI as a non-invasive method to measure body composition within one animal at multiple time-point during a study, so leads to both refinement as well as reduction). All animal handlings will be carried out by authorized and qualified persons. Where possible, all animals will be group housed and environmental enrichment will be provided.

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

Appropriate possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. All work will be carried out by a small number of highly trained bio-technicians. Injection fluids will be brought to room or body temperature before injection. In consultation with the attending veterinarian, surgery appropriate peri-operative care, including appropriate anaesthesia and analgesia, is determined and frequently reviewed and updated towards best practices. The welfare of the animals will be daily observed by different people. If there are clear signs of unexpected severe discomfort, the animals will be euthanized. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions.

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.

For more invasive procedures appropriate anesthesia / analgesia will be used or procedure will be terminal. In consultation with the attending veterinarian, surgery protocols, including appropriate anaesthesia and analgesia is determined and frequently reviewed and updated towards best practices.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The induction of the metabolic disorders obesity, hyperlipidemia, atherosclerosis and NASH do not lead to discomfort. Similarly as in humans, that are often unaware of these disturbances until a very late stage. For most Diabetes studies (>95%) we will also not reach the very severe diabetic stage which is accompanied by discomfort to the mice. Only in long-lasting Diabetes and in nephropathy studies using db/db or KKA^y mice, severe Diabetes, characterized by polyuria, can develop and can lead to (moderate) discomfort.

With respect to discomfort caused by interventions: it is possible that novel compounds have an adverse effect in these animal models, especially during the disease induction in NASH studies when normal liver function gets compromised.

Explain why these effects may emerge.

Although most novel compounds to be tested are expected to have a beneficial effect, we cannot exclude the possibility that the combination of the novel compound with our models leads to unexpected adverse effects. The likelihood (based on historical data of last 5 years) is <0.1%.

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

Upon start of treatment/intervention mice will be closely monitored and upon signs of discomfort or adverse effects, the situation will be discussed with the animal welfare officer or veterinarian and if possible proper measurements will be taken to relief the animal discomfort or animals will be taken out of experiment and sacrificed.

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.

In general the induction of the metabolic disorder(s) do not lead to discomfort. Treatments of the animals can have adverse effects and may lead to (unexpected) discomfort. Mice will be monitored daily and in case of discomfort, cages will be labeled and the affected mice will be closely monitored to observe whether the health status is improving or deteriorating. Deterioration of the health status with unexpected weight loss severe wounds and/or signs of general sickness and/or discomfort, will lead to the decision that mice will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

For obesity, Diabetes, lipid, atherosclerosis, NASH, nephropathy and retinopathy studies: <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').

In general, the cumulative discomfort for metabolic disorder(s) studies will be mild to moderate and will not extend beyond moderate. The different procedures that can be used, will all be within good practice and are assigned to the following categories:

Animal procedure:	Level of discomfort:
Diet interventions	mild
Drinking water interventions	mild
D ₂ O drinking water	mild
Exercise (running-wheel)	mild
Grip strength and inverted screen test	mild
4 or 5 hours fasting	mild
Overnight fasting	mild
Multiple blood sampling via tail vein within good practice	mild
Single or multiple gavage or injections (iv, ip, im, sc)	mild
Urine collection	mild
Feces collection or fecal swabs	mild
Indirect calorimetry (TSE systems)	mild
EchoMRI	mild
Non-invasive imaging	mild - moderate
Glucose tolerance test	moderate
Insulin tolerance test	moderate
Hyperinsulinemic euglycemic clamps	non-recovery
Hyperglycemic clamp	non-recovery
Glomerular filtration rate	moderate
VLDL production test	non-recovery
VLDL clearance test	non-recovery
Blood pressure measurements	mild - moderate
Challenge tests	mild - moderate
Surgery: s.c. osmotic minipumps	moderate
Surgery: liver lobe dissection / liver biopsy	moderate
Surgery: fat removal / transplantation	moderate
Surgery: kidney mass removal	moderate
Surgery: gall bladder cannulation	non recovery
Euthanasia	mild
Long-lasting studies using db/db mice	mild - moderate
Long-lasting studies using KKA ^y mice	mild - moderate

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.

Metabolic disease manifests within tissues and cannot be analyzed only via plasma. Therefore, the tissues are needed for measurements: heart, aortic root or aorta for atherosclerosis analysis; livers for NASH and fibrosis measurements; kidneys for analysis of nephropathy; eyes for analysis of retinopathy.

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

om te werken aan het voorkomen en behandelen van metabole problematiek. En kunt u in relatie daarmee ook expliciet aangeven waarom de diermodellen in het voorgestelde projectvoorstel als geheel afgewogen moeten worden?

Samenhang ziektemodellen & noodzaak van gebruik diermodellen: De verschillende metabole aandoeningen zijn geen aparte ziekten maar zijn gerelateerd: de metabole aandoeningen komen gezamenlijk voor en de aanwezigheid van 1 van deze metabole aandoeningen verhoogt de kans om ook 1 van de andere aandoeningen te krijgen. De aanwezigheid van meerdere aandoeningen tegelijkertijd leidt ook tot een hogere kans op de ontwikkeling van cardiovasculaire ziekten of Type 2 Diabetes dan bij aanwezigheid van slechts 1 van de aandoeningen. Bovendien spelen gemeenschappelijke onderliggende pathways en mechanismes een rol.

Doordat deze samenhang intrinsiek aanwezig is, is het juist noodzakelijk om ook in het onderzoek hiernaar, niet alleen de afzonderlijke aandoeningen te bestuderen, maar de samenhang hier tussen zoveel mogelijk mee te nemen. Om nieuwe behandelingen te testen zijn op dit moment diermodellen nog vereist. Het is niet mogelijk (en zeer gevaarlijk) om nieuwe behandelingen gelijk in patiënten te testen. In vitro model systemen zijn behulpzaam om informatie over aandoeningen per orgaansysteem te onderzoeken maar leveren (nog) onvoldoende informatie over de complexe samenhang tussen verschillende metabool actieve organen. Daarom zijn diermodellen nodig om deze samenhang tussen de organen te bestuderen.

Om dit antwoord duidelijker in de aanvraag & bijlage te beschrijven is extra tekst toegevoegd onder 3.1 in de aanvraag en A van de bijlage (aangegeven in rood).

2. In 3.1, Background, schetst u de achtergrond van uw projectvoorstel wat betreft de humane kant, maar niet de achtergrond van de stap naar het diermodel. Kunt u hier de informatie uit figuur 3.1 direct relateren aan de diermodellen die u gaat gebruiken? U kunt hier of in de bijlage ook met een figuur helder maken hoe de dieren (incl. genetische achtergrond), de interventie (voedsel of farmaca) en de uitleesparameters maken dat ook de diermodellen allemaal volgens een vergelijkbaar stramien gecreëerd worden. Hier kunt u ook aan refereren in de strategie van 3.4.3.

Stap naar diermodel & figuur diermodellen: De noodzaak van de stap naar diermodellen is nu nav het antwoord op vraag 1 al toegevoegd onder 3.1 in de aanvraag. Daarnaast is een tabel toegevoegd bij 3.4.3 met meer informatie over de verschillende diermodellen volgens de verschillende metabole aandoeningen gerelateerd aan figuur 3.1.

3. Wij missen in het voorstel voor een deel de strategie: welke stappen zet u om keuzes te maken tussen studies, modellen, interventies en metingen? Op welke mechanismen ligt de focus en waarom, of hoe wordt die focus in de loop van het project bepaald?

Strategie voor wat betreft studies, modellen, interventies en metingen: Alle studies, diermodellen, interventies en metingen die momenteel worden gedaan zijn beschreven in de huidige aanvraag. De keuzes hiertussen zullen voor de komende 5 jaar afhangen van de ontwikkelingen in het onderzoeksveld en de focus van bedrijven die nieuwe therapieën (compounds/nutrities) ontwikkelen. De verwachting voor de komende 5 jaar is op dit moment dat de focus voor een aanzienlijk deel op NASH studies komt te liggen. Ook hyperlipidemie en atherosclerose zal een blijvend aandeel hebben. Met de nieuwe cardiovasculaire therapieën die momenteel in ontwikkeling zijn is het mogelijk om in combinatie therapie een verdere verlaging van de hyperlipidemie te krijgen waardoor ook een mogelijke regressie van atherosclerotische plaques in zicht komt (i.p.v. alleen verder progressie voorkomen). Een verder gaande verschuiving naar combinatie therapieën en regressie studies is dus te verwachten. Daarnaast is de verwachting dat er ook meer aandacht komt voor diabetische atherosclerose. Voor wat betreft nephropathy verwachten we de komende jaren minder studies: het blijkt erg lastig te zijn om een translationeel model te verkrijgen met een vergelijkbare pathologie als in de mens. Om die reden staat het aanbieden van deze diermodellen momenteel ter discussie. Retinopathy is binnen onze groep een relatief nieuw onderzoeksveld waarbij we nog in een wat exploratieve fase zitten. Bij gunstige resultaten (ontwikkeling van een translationeel model) verwachten we dat dit een groei gebied is. Daarnaast valt op dat de cross-talk tussen organen (darm, vet, spier, brein & lever) en het onderzoek naar biomarkers een groeiend onderzoeksveld is, waar we naar verwachting ook de komende jaren meer aandacht aan zullen besteden.

Bovenstaande informatie is nu toegevoegd in de hoofdaanvraag onder 3.4.1.

4. In 3.2 noemt u de mogelijkheid: "An improvement of the model could be via adaptations of the diets used to induce the disease or by genetic interventions, for instance via cross-breeding of different transgenic mice, resulting in a novel animal model with a desired phenotype." Valt dit naar uw idee binnen deze projectaanvraag, en zo ja, hoe garandeert u dat dit geen extra ongerief oplevert? Anderzijds noemt u in de bijlage onder B, Animals, alle te gebruiken diermodellen bij naam. Ons is daardoor niet duidelijk of we het creëren van nieuwe genetische achtergronden moeten incalculeren.

Cross-breeding van nieuwe muizen: Op dit moment werken wij met ApoE*3Leiden en ApoE*3Leiden.CETP muizen die alleen heterozygoot gefokt kunnen worden. Dit heeft te maken met de insertie van het E3Leiden transgen op een positie waardoor de homozygoten niet worden geboren. Om de fok efficiënter te maken en overschot muizen met een verkeerd genotype te voorkomen, is inmiddels een nieuwe ApoE*3Leiden muizen gemaakt die wel homozygoot fokbaar is. Op dit moment lopen de 1^e validatie studies (lipid-, athero- en NASH studies) om de respons op dieet en therapieën te testen. Deze resultaten zijn veelbelovend en we verwachten op dit moment dat wij de heterozygote fok in de toekomst kunnen vervangen door een homozygote fok.

Met een homozygote muis komt ook de mogelijkheid tot cross-breeden met andere muizen weer in zicht. Hierbij valt in 1^e instantie te denken aan de GK+/- muis, een diabetische muis die een verlaagde expressie van het glucokinase enzym laat zien. In samenwerking met een buitenlandse partner hebben wij al experimenten gedaan met E3L.GK+/- muizen (nu nog met een zeer inefficiënte dubbelheterozygote fok) waaruit bleek dat bij deze muizen het diabetische fenotype van de GK+/- muis wordt gecombineerd met de dyslipidemie van de E3L muis. Bij het cross-breeden voor nieuwe muismodellen zoals nu genoemd in de aanvraag dachten wij in 1^e instantie aan de E3L.GK+/- muis (maar dan gefokt met de nieuwe homozygote E3L muis). Mogelijk dat echter ook andere cross-breeders dan interessant worden. *Wij hebben nu in de aanvraag de E3L.GK+/- expliciet genoemd bij 3.2. Van deze muis weten we al dat deze muis geen ongerief heeft vanwege het ziektemodel. Voor andere cross-breedings stellen we voor dat we nieuwe cross-breeders zullen melden, en indien onverhoopt sprake blijkt te zijn van constitutioneel ongerief, wij dit middels een wijziging op de projectaanvraag ethisch zullen laten toetsen.*

5. Eveneens in 3.2 zouden we meer willen lezen over de haalbaarheid, namelijk in hoeverre uw onderzoeksgroep al succesvol is geweest in het onderzoeksveld. Wat maakt dat deze groep geschikt is om dit project uit te voeren?

Haalbaarheid binnen onze onderzoeksgroep: Zoals beschreven onder 3.2 heeft onze onderzoeksgroep een ruime ervaring in dit onderzoeksveld. Dat komt tot uiting in de vele publicaties op dit gebied. Er zijn zeer veel verschillende klassen van compounds of nutties waar wij onderzoek naar hebben gedaan. Enkele belangrijke klassen hiervan zijn nu toegevoegd als voorbeeld. Echter deze voorbeelden omvatten bij lange na niet al onze publicaties, laat staan al onze uitgevoerde studies. Dit gezamenlijk met ons uitgebreide netwerk met academische groepen, de farmaceutische industrie, voedingsbedrijven, biotech bedrijven, medische centra, patiëntenorganisaties en overheden, maakt onze groep uitermate geschikt om dit project uit te voeren. *Enkele voorbeelden zijn nu toegevoegd bij 3.2.*

6. Het ongerief inherent aan de ziektemodellen is niet eenduidig omschreven. In I beschrijft u dat bij een aantal metabole ziektebeelden in de dieren geen ongerief komt kijken, maar dat bij diabetes en nefropatie wel polyuria voorkomt, terwijl in de NTS staat dat de dieren gericht ongerief ondervinden van het metabole ziektebeeld zelf. Kunt u per ziektebeeld heel specifiek aangeven wat u verwacht, en dit consequent doorvoeren in de gehele aanvraag? En daarmee dit ongerief ook meenemen in de classificatie van het ongerief in K?

Ongerief ziektemodellen niet eenduidig: Voor alle ziektemodellen geldt dat het ongerief als gevolg van de ontwikkeling van de ziekte **niet** tot ongerief leidt. **Uitzondering** hierop zijn de langdurige diabetes of nephropathy studies met db/db of KKA^y muizen. Alleen bij langdurige proeven met deze modellen kan ernstige diabetes optreden (met o.a. polyuria) wat dan gering tot matig ongerief tot gevolg heeft. *In de NTS stond dit niet duidelijk omschreven en is dit aangepast onder 3.4. (met track-changes). Aangezien de handelingen wel tot wat ongerief leiden, is het totale ongerief van de dierproeven bij 3.5 ingedeeld als 90% gering en 10% matig. De tekst in de appendix onder I klopte wel en is niet aangepast, wel is bij K een toevoeging aan de tabel gedaan. De langdurige modellen waarbij wel ongerief kan plaats vinden als gevolg van de ziekte inductie zijn nu toegevoegd in de tabel.*

7. Wij vragen ons af in hoeverre het ongerief bij de verschillende interventies, zoals beschreven in de bijlage onder K, voor alle ziektemodellen gelijk is. Het zou inzicht bieden als u in de figuur, zoals gesuggereerd in vraag 2, ook het (mogelijke) ongerief opneemt.

Ongerief interventies & ziektemodellen: Zoals hierboven ook beschreven leiden de verschillende ziektemodellen in het algemeen en in de overgrote meerderheid van onze studies niet tot ongerief. Met als enige uitzondering de langdurige experimenten met db/db of KKA^y muizen, waarbij ernstige diabetes kan ontstaan met gering-matig ongerief. Het ongerief van de handelingen zoals beschreven in de appendix in de tabel onder K is hetzelfde voor de verschillende modellen. Alleen het model zelf kan dus extra ongerief opleveren bij langdurige proeven met db/db of KKA^y muizen. *In de toegevoegde tabel onder 3.4.3 van de hoofdvraag is dit als opmerking toegevoegd bij de betreffende modellen.*

Overig: Bij de appendix stond onder A bij atherosclerose studies de bloeddruk metingen niet vermeld, dit is nog toegevoegd.

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

- Aard expertise: n.v.t.
- Deskundigheid expert: n.v.t.
- Datum verzoek: n.v.t.
- Strekking van het verzoek: n.v.t.
- Datum expert advies: n.v.t.
- Advies expert: 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 zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het gaat om experimenten rond metabole aandoeningen, met een duidelijke strategie en opzet. De samenhang in het voorstel is sterk gebaseerd op de samenhang van metabole aandoeningen, zoals is toegelicht in het antwoord op vraag 1 van de DEC aan de onderzoekers (zie hierboven). Door de strategie die is beschreven in 3.4.1 is de DEC ervan overtuigd dat de experimenten ingebed zijn in een passende reeks van andere projecten en experimenten. Met de beantwoording van vraag 2 van de DEC (hierboven) maakt de aanvrager duidelijk verantwoorde keuzes te kunnen en te zullen maken wat betreft de focus binnen het project. Hoewel studies binnen deze projectaanvraag lijken te verschillen is juist dit onderdeel bediscussieerd door de DEC. De metabole ziekten zijn geen geïsoleerde verschijnselen. Patiënten ontwikkelen de pathologieën simultaan in meer of mindere mate in de verschillende stadia (figuur 1). De verschillende verschijningsvormen zijn ook nog eens van invloed op elkaar. Daarmee is de DEC ervan overtuigd dat afhankelijk van de vraagstelling verschillende combinaties bestudeerd dienen te worden. Wij hebben uitgebreid gesproken of de manier van presenteren toetsbaar is in deze vorm. Wij zijn tot de conclusie gekomen dat juist het samenbrengen van de verschillende pathologieën recht doet aan de daadwerkelijke complexiteit van metabole ziekten in de mens, juist omdat het een multifactorieel probleem is dat verschillende uittingsvormen kent en waarbij het modelleren in een dier maatwerk en flexibiliteit in het gehele spectrum vereist.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en). Er is zowel sprake van fundamenteel als translationeel/toegepast onderzoek. Het eerste type experimenten draagt bij aan kennis rond metabole aandoeningen, het tweede type betreft het testen van therapieën voor metabole aandoeningen, gericht op translatie naar de mens.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzicht in de onderliggende mechanismen van die metabole aandoeningen stimuleren of juist afremmen, en daarnaast meer weten over de effectiviteit van therapieën. Het uiteindelijke doel van het project is om hiermee bij te dragen aan de preventie en behandeling van metabole aandoeningen. De aanvrager heeft voldoende duidelijk gemaakt dat met het project daadwerkelijk een substantiële bijdrage aan dit

uiteindelijke doel kan worden gedaan, en dus dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: patiënten van metabole aandoeningen en de muizen die als proefdier gebruikt worden. Daarnaast hebben opdrachtgevers belang bij informatie over hun product. Ook de uitvoerende organisatie en de medewerkers die aan het onderzoek werken hebben een belang. Voor de patiënten zijn in het geding de waarden: leven, gezondheid, welzijn, activiteiten kunnen ontplooiën. Voor de proefdieren zijn in het geding de waarden: leven, gezondheid, welzijn en natuurlijk gedrag kunnen vertonen. Voor de opdrachtgevers en de uitvoerende organisatie gaat het voornamelijk om een economisch belang. Voor de betrokken medewerkers van TNO gaat het om hun professionele ontwikkeling.
6. De DEC ziet geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

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 aanvrager vermeldt in het antwoord op vraag 5 de benodigde deskundigheid en ervaring van de onderzoeksgroep. Op grond van deze beschrijving en de publicaties ziet de DEC geen reden om te twijfelen aan de haalbaarheid zoals die is omschreven door de onderzoekers. Dit geldt, door de genoemde ervaring, ook voor de toepassing van de 3 V's. Daarnaast benadrukt de DEC dat een deel van dit werk ingegeven wordt door de mogelijkheid om een diermodel meer te laten lijken op de humane situatie. Afhankelijk van resultaten kan er een verlegging van focus komen binnen dit zeer specifieke veld. Dit hebben de onderzoekers helder beschreven in het antwoord op vraag 3.
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. De onderzoekers beschrijven een uiteindelijk doel van deze hele onderzoekslijn, maar specificeren ook het doel voor de komende 5 jaar: een beter begrip van de mechanismen die ten grondslag liggen aan metabole ziekten, om bij te dragen aan het voorkomen en/of het behandelen van de ziekteontwikkeling. Daarvoor beschrijven de onderzoekers studies waarvan de uitkomsten zullen bijdragen aan dit doel, namelijk effectiviteitsstudies en studies ten behoeve van de verbetering van diermodellen of het verkrijgen van meer informatie uit de bestaande diermodellen. De DEC denkt dat het reëel is dat de voorgestelde opzet bij zal dragen aan kennis van, preventie van, en behandeling van metabole aandoeningen, juist ook omdat de onderzoekers op verschillende plekken specifiek het gebruik van humaan materiaal en data in

deze zelfde context beschrijven. Dit getuigt van een constante zoektocht naar transleerbaarheid van de modellen.

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. Het is ingeschat als maximaal matig. Enige onduidelijkheid hierover is opgehelderd in de antwoorden op de vragen 6 en 7 (zie hierboven). De DEC begrijpt nu dat de meeste diermodellen geen inherent ongerief met zich meebrengen, maar dat de combinatie van handelingen zoals specifiek aangegeven in onderdeel K van de bijlage tot maximaal matig ongerief kan leiden. Met de specifiek beschreven uitkomstparameters in combinatie met de uitgebreid beschreven handelingen die daarvoor nodig zijn, komt ook de DEC tot de conclusie dat deze studies cumulatief niet meer dan matig ongerief zullen berokkenen aan de dieren. De DEC staat ook achter het gebruik van de 2 diermodellen die wel inherent ongerief met zich meebrengen, omdat deze diermodellen, zoals aangegeven in tabel 1 (onderdeel 3.4.3 van het projectvoorstel) noodzakelijk zijn om onderzoeksvragen in het kader van één van de uitkomstmaten van metabole ziekten, namelijk in het kader van type 2 diabetes, te beantwoorden. De DEC kan zich vinden in de verwachte percentages van dieren die dit ongerief zullen ervaren zoals omschreven in de NTS, maar ziet dit vooral als een inschatting, omdat de strategie zodanig is opgezet dat de focus binnen deze aanvraag kan wijzigen, doordat het werk afhankelijk is van samenwerking met of opdrachten van externe partners. Omdat het de DEC in eerste instantie niet duidelijk was of er ook sprake kon zijn van nieuwe genetisch gemodificeerde muizentypen, met mogelijk extra ongerief, is daarover een vraag gesteld aan de aanvrager (vraag 4 hierboven). Een aanpassing in de aanvraag sluit uit dat binnen dit project andere genetisch gewijzigde lijnen zullen worden gebruikt of gefokt met ongerief (3.2 van het projectvoorstel).

12. De integriteit van de dieren wordt aangetast in die zin dat ze als proefdier worden gebruikt en worden gedood. Er is geen andere aantasting van de integriteit van het dier.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Het gaat om een laag percentage (<1%) dat passend is bij het houden van gezonde proefdieren. De criteria zijn duidelijk en passend, en de monitoring is adequaat ingericht.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn voor het bestuderen van gelijktijdige verstoring in meerdere organen door metabole aandoeningen en voor het bestuderen van het mechanisme achter effecten van nieuwe medicijnen op dergelijke complexe processen. De aanvrager heeft aan de DEC duidelijk gemaakt in 3.4.1 dat het gebruiken van diermodellen vooraf wordt gegaan door *in vitro* studies, literatuur, humane studies en/of studies op humaan materiaal. In onderdeel D van de bijlage wordt hier uitgebreid op ingegaan.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat op grond van literatuur en statistiek. 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, door deze bronnen per experiment zorgvuldig in te zetten en studies te combineren. De DEC TNO stelt op grond van ervaring met het bediscussiëren van DEC-aanvragen dat het combineren van experimenten om zo efficiënt om te gaan met dieren een intentie is die steeds hoog op de agenda staat. De aantallen dieren per studie zijn realistisch ingeschat, en door *low responders* aan het begin van de studie te excluderen worden de data minder gevarieerd en zijn er uiteindelijk minder dieren nodig om de gehele studie te doorlopen. Dit is een strategie die ook bij verfijning zou passen. Daarnaast geven de onderzoekers aan zoveel mogelijk te zoeken naar kwantitatieve meetmethoden waarbij de gevoeligere parametrische testen gebruikt kunnen worden. Ten slotte wordt ook een strategie beschreven waarbij dieren al vroeg op een hoog-vetdieet worden gezet en ook al in een vroeg stadium bloedmonsters afgeven. Hierdoor zal het indelen van dieren naar de verschillende studies efficiënt kunnen gebeuren, zonder dat de dieren te oud zijn geworden om nog te gebruiken. Het nemen van bloedmonsters van deze dieren is ook onderdeel van het uiteindelijke experiment.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk stress en ongerief gepaard gaan. Een voorbeeld daarvan zijn de niet-invasieve meet technieken die de onderzoekers beschrijven. Daarnaast getuigt tabel 1 van inzicht in de te gebruiken modellen, waardoor wordt gegarandeerd dat het passende diermodel gekozen wordt bij de vraagstelling.
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 globaal in gelijke mate worden ingezet. Bij enkele optionele experimenten (NASH) staat beschreven hoe er aandacht is aan de mogelijkheid om dit op een verantwoorde wijze te gaan doen, terwijl vooralsnog mannelijke muizen worden ingezet. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om eventueel enkele proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren (zie bijlage, 2B.)
19. De dieren worden in het kader van het project gedood omdat het noodzakelijk is voor de te behalen doelen om weefsels van het dode dier te bestuderen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel specifieke typen muizen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in processen en therapieën bij metabole ziekten en het terminale, lichte en/of matige ongerief en de dood van 10.000 muizen?
2. De waarden die in het geding zijn voor de patiënten en de dieren zijn groot. Metabole ziekten kunnen veel problemen geven op het gebied van welzijn en functioneren, tot en met de dood als gevolg. Bij de experimenten komt licht (90% van de dieren) of matig (10% van de dieren) ongerief kijken voor maximaal 10.000 dieren.
3. De DEC is overtuigd van het belang van het behalen van de doelstellingen: meer weten over onderliggende mechanismen van metabole aandoeningen en over de effectiviteit van therapieën. Doordat de oorzaak van het ontwikkelen van metabole ziekten multifactorieel is (levensstijl, aanleg en opvoeding spelen een rol in de pathologie), is fundamenteel en translationeel onderzoek nodig om inzicht te krijgen in het ziekteverloop en in mogelijke passende behandelstrategieën. Het feit dat deze aandoeningen afhankelijk zijn van veel factoren, maakt dieronderzoek een essentiële stap in iedere fase van het onderzoek naar deze ziekten. De DEC TNO is van mening dat het verkrijgen van meer inzicht in metabole ziekten

volgens de doelstelling, het gebruik van de genoemde proefdieren, met daarbij meestal licht, maar ook in 10% van de dieren matig ongerief, rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

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, behalve de vraagstukken die zijn benoemd in de vragen aan de aanvrager. Deze zijn wat betreft de DEC naar tevredenheid beantwoord.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

[Redacted]

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**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
AVD5010020172064

Bijlagen

2

Datum 20 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 9 juni 2017. Het gaat om uw project "Prevention and treatment of metabolic disorders.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5010020172064. 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:

20 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5010020172064

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.


Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur




Datum:
20 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD5010020172064

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50100
Naam instelling of organisatie: TNO
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 27376655
Postbus: 96800
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG
IBAN: NL39INGB0657819271
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: TNO

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
20 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD5010020172064

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2018
Geplande einddatum: 31 december 2023
Titel project: Prevention and treatment of metabolic disorders.
Titel niet-technische samenvatting: De preventie en behandeling van metabole ziekten.
Naam DEC: DEC-TNO
Postadres DEC: 96800 2509 JE DEN HAAG
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:

Functie:

Plaats:

Datum:



Den Haag

9 juni 2017

Datum:

20 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5010020172064



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO
T.a.v. Accounts Payable
Postbus 96829
2509 JE DEN HAAG



**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
AVD5010020172064
Bijlagen
2

Datum 20 juni 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 20 juni 2017
Vervaldatum: 20 juli 2017
Factuurnummer: 172064
Ordernummer: s.v.p. uw factuur o.v.v. 'vooruitbetaling' en het bestelnummer 3100165835/1

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5010020172064	€ 1035,00

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: maandag 19 juni 2017 16:43
Aan: Info-zbo
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: AVD5010020172064: aanhouden beoordelen

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Dank voor de snelle reactie op onze e-mail. Wij willen de aanvraag niet opsplitsen. Aan de hand van een aantal voorbeeldstudies die onder deze aanvraag gedaan zullen worden, wil ik nog nader toelichten, waarom dat in onze ogen niet verstandig is en voor de IvD ingewikkeld wordt voor de beoordeling.

In de Bijlage worden een aantal primaire eindpunten genoemd, die de CCD wellicht het idee geven dat het om separate studies gaat. Dat betreft dan: obesitas, diabetes, lipid metabolisme, atherosclerose, NASH, nephropathie en retinopathie. Dat hierbij het woord 'studies' is gebruikt is, zo zie ik nu in, verwarrend, aangezien het niet gaat om separate studies, maar om primaire eindpunten.

De studies die worden uitgevoerd betreffen vrijwel altijd studies waarbij combinaties van bovenstaande eindpunten tegelijk bestudeerd worden. De inductie van metabool syndroom vindt altijd op dezelfde manier plaats, namelijk met een dieet, waarbij de combinatie van de muizenstam/sexe met het type dieet bepalend is voor welk eindpunt het meest zichtbaar wordt in het dier.

Een daadwerkelijke studie is echter vrijwel nooit gericht op slechts 1 eindpunt (bijvoorbeeld: alleen obesitas), maar is altijd gericht op een combinatie van eindpunten die simultaan ontwikkelen. Zo hebben wij in het verleden veel studies uitgevoerd die atherosclerose en nash combineren (vrouwelijke ApoE*3Leiden muizen op een hoog cholesterol dieet), die obesitas en nash combineren (Mannelijke C57Bl6 muizen op een hoog vet dieet, aangevuld met vet removal), en ook studies die diabetes, nephropathie, obesitas, atherosclerose en nash combineren (LDLR-/- muizen op een hoog vet dieet.).

Het gevolg van het opsplitsen van de bijlagen zal dan zijn dat hetzij vrijwel alle handelingen in alle bijlagen moeten worden opgenomen, of dat er telkens verwezen moet worden naar andere bijlagen. Ons inziens wordt het geheel dan echt zeer onoverzichtelijk voor de onderzoeker om de studie te onderbouwen en voor de IvD om deze te beoordelen. Wat betreft de opmerking over het niet goed kunnen inschatten van het cumulatieve ongerief, staat in de aanvraag vermeld dat er een keuze uit verschillende procedures zal worden gemaakt, passende bij de vraagstelling, waarbij het cumulatieve ongerief niet boven moderate uit zal komen. Ook bij opsplitsen van de aanvraag in verschillende bijlages zal deze formulering nog steeds gelden omdat per studie wordt gekeken welke handelingen nodig zijn om de vraagstelling goed te kunnen beantwoorden.

Graag zie wij daarom dat de aanvraag zoals ingestuurd, inclusief onze onderbouwing plus nadere uitleg in deze e-mail, aan de CCD wordt voorgelegd.

Vriendelijke groet, mede namens de verantwoordelijk onderzoeker, [REDACTED]

[REDACTED] Location

TNO innovation for life

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message. TNO accepts no liability for the content of this e-mail, for the manner in which you use it and for damage of any kind resulting from the risks inherent to the electronic transmission of messages.

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: maandag 19 juni 2017 10:58
To: [REDACTED]

Cc: [REDACTED]
Subject: RE: AVD5010020172064: aanhouden beoordelen

Geachte [REDACTED]

De CCD hanteert het beleid dat binnen elke bijlage de handelingen die de dieren ondergaan vergelijkbaar moeten zijn. Er zijn wel degelijk grote verschillen in handelingen tussen de verschillende studies. Daarbij komt dat de aanvraag op deze wijze zeer lastig te beoordelen is en niet geheel duidelijk is wat er precies met welk dier gaat gebeuren. Er is ook geen zicht op het cumulatieve ongerief dat de dieren per studie ondergaan.

Ook als er sprake zou zijn van combinaties van studies, lijkt deze aanvraag in meerdere bijlages te kunnen worden opgesplitst. Het is overigens ook geen probleem als dieren in meerdere bijlages gebruikt worden.

Ik zal jullie argumentatie om de aanvraag niet te splitsen met de aanvraag zelf aan de CCD voorleggen. Aangezien jullie argumentatie geen nieuw licht op de zaak werpt, ben ik echter niet optimistisch over de uitkomst. Ik adviseer daarom de aanvraag toch te splitsen. Ik hoor graag vandaag of jullie de aanvraag alsnog willen splitsen. Als jullie hier niet voor kiezen, zal ik het secretariaat vragen jullie de factuur te sturen.

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: woensdag 14 juni 2017 16:09
Aan: Info-zbo
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: AVD5010020172064: aanhouden beoordelen

Geachte [REDACTED]

Wij begrijpen onderstaand verzoek van de CCD om de aanvraag te splitsen in meerdere bijlagen niet. De CCD geeft aan dat in de bijlage meerdere diermodellen worden beschreven met specifieke handelingen, effecten op het dierenwelzijn en humane eindpunten. Dat is niet juist. In de bijlage zijn verschillende metabole eindpunten beschreven waarbij in een werkprotocol, afhankelijk van de vraagstelling, als het ware wordt gekozen uit een palet aan muizenstammen, inductiemethoden en uitleesparameters die het best passen bij de vraag die op dat moment voorligt. Het palet blijft gelijk, de keuzes bepalen de balans tussen welke parameters/pathologieën de primaire en welke de secundaire uitleesparameters zijn. Door de bijlage op te splitsen gaat de samenhang die deze verschillende pathologieën hebben binnen de ontwikkeling van metabool syndroom, verloren. Bovendien zal dit de beoordeling van afzonderlijke werkprotocollen door de IvD onnodig bemoeilijken, omdat een werkprotocol dan zal bestaan uit aspecten die zijn opgesplitst over verschillende bijlagen.

De DEC heeft in haar vergadering eveneens uitgebreid aandacht besteed aan het belang van de eenheid in deze projectaanvraag. Zij zegt hierover in haar advies:
Hoewel studies binnen deze projectaanvraag lijken te verschillen is juist dit onderdeel bediscussieerd door de DEC. De metabole ziekten zijn geen geïsoleerde verschijnselen. Patiënten ontwikkelen de pathologieën simultaan in meer of mindere mate in de verschillende stadia (figuur 1). De verschillende verschijningsvormen zijn ook nog eens van invloed op elkaar. Daarmee is de DEC ervan overtuigd dat afhankelijk van de vraagstelling verschillende combinaties bestudeerd dienen te worden. Wij hebben uitgebreid gesproken over de manier van presenteren toetsbaar is in deze vorm. Wij zijn tot de conclusie gekomen dat juist het samenbrengen van de verschillende pathologieën recht doet aan de daadwerkelijke complexiteit van metabole ziekten in de mens, juist omdat het een multifactorieel probleem is dat verschillende uittingsvormen kent en waarbij het modelleren in een dier maatwerk en flexibiliteit in het gehele spectrum vereist.

Ik verzoek de CCD derhalve om de beslissing tot het opsplitsen van de aanvraag te heroverwegen en de aanvraag in behandeling te nemen zoals hij is aangeboden aan de CCD en van een DEC advies is voorzien.

Vriendelijke groet, [REDACTED]



Location



This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message. TNO accepts no liability for the content of this e-mail, for the manner in which you use it and for damage of any kind resulting from the risks inherent to the electronic transmission of messages.

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: dinsdag 13 juni 2017 18:45
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: AVD5010020172064: aanhouden beoordelen

Geachte [REDACTED]

Op 09 juni 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met als titel 'Prevention and treatment of metabolic disorders' met als aanvraagnummer AVD5010020172064.

Uw aanvraag bestaat uit 1 bijlage dierproeven. In deze bijlage dierproeven beschrijft u echter meerdere diermodellen waarbij de dieren hele andere handelingen ondergaan. Aangezien de handelingen aan de dieren, de effecten op het dierenwelzijn, de mogelijkheden voor pijnbestrijding en de humane eindpunten specifiek zijn voor elk van deze modellen, kunt u deze modellen niet in dezelfde bijlage dierproeven beschrijven. U wordt verzocht uw aanvraag op te splitsen in meerdere bijlagen dierproeven, zodanig dat binnen een bijlage dierproeven de dieren in principe dezelfde handelingen ondergaan, en voor elk van de modellen inzichtelijk te maken hoeveel dieren daarvoor gebruikt worden en welk ongerief de dieren ondergaan. U wordt daarnaast verzocht een nieuw aanvraagformulier in te sturen waarin de leges zijn aangepast.

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om de aangepaste aanvraag op te sturen. Mocht u meer tijd nodig hebben, wordt u verzocht dit aan te geven. U kunt uw aanvraag onder vermelding van de titel en het aanvraagnummer aanleveren via NetFTP, per e-mail of per post.

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,



Namens,

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

TNO
[Redacted]
Postbus 96800
2509 JE DEN HAAG
[Barcode]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5010020172064
Bijlagen
1

Datum 18 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte mevrouw [Redacted]

Op 9 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Prevention and treatment of metabolic disorders." met aanvraagnummer AVD5010020172064. 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 "Prevention and treatment of metabolic disorders." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 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.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-TNO gevoegd. Dit advies is opgesteld op 6 juni 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:
18 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD5010020172064

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: TNO
Adres: Postbus 96800
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG
Deelnemersnummer: 50100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Prevention and treatment of metabolic disorders." met aanvraagnummer AVD5010020172064, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-TNO. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

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

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Metabolic disorder(s) study				
	Muizen (Mus musculus) /	10.000	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

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.

Aanvraagnummer:
AVD5010020172064

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:

AVD5010020172064

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 verdooving

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

Aanvraagnummer:

AVD5010020172064

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 humanaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS20172104	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x	x	



02 JUNI 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 type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 32600 <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>Intravacc</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td></td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Intravacc	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer										
Naam instelling of organisatie	Intravacc																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Antinie van Leeuwenhoeklaan</td> <td>9</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>450</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>3720AL</td> <td>Bilthoven</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL74INGB0705003612</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>PD ALT</td> <td></td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Antinie van Leeuwenhoeklaan	9	Postbus	450		Postcode en plaats	3720AL	Bilthoven	IBAN	NL74INGB0705003612		Tenaamstelling van het rekeningnummer	PD ALT	
Straat en huisnummer	Antinie 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.	<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>Projectleider/onderzoeker</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>RIVM [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	Projectleider/onderzoeker		Afdeling	RIVM [REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Projectleider/onderzoeker																
Afdeling	RIVM [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>Projectleider</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>RIVM [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	Projectleider		Afdeling	RIVM [REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Projectleider																
Afdeling	RIVM [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 1 - 7 - 2017
- Einddatum 30 - 6 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Zoönotische pathogenen bij wilde knaagdieren
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Zoönotische pathogenen bij wilde knaagdieren
- 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 [REDACTED], 3720 AL Bilthoven
- E-mailadres [REDACTED]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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 Bilthoven

Datum 8 - 6 - 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.zbo-ccd.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. Zoönotische pathogenen bij wilde knaagdieren

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- 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 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.

Dit onderzoek maakt deel uit van het knaagdieronderzoek dat bij onze organisatie wordt uitgevoerd in opdracht van het Ministerie van VWS (en voorheen ook de NVWA). Er is een maatschappelijk belang om de kennis van zoonotische pathogenen bij wilde knaagdieren in Nederland te vergroten. In 2010 bleek uit het Emerging Zoonoses rapport dat bij veel opkomende zoonosen knaagdieren een rol spelen, maar dat er weinig bekend is over de zoonosen die bij in Nederland voorkomende wilde knaagdieren kunnen voorkomen. Wat bijvoorbeeld de rol van ratten is geweest bij de toename van autochtone leptospirose patienten in 2014 en 2015, of hoe we de risico's voor het oplopen van Hantavirusinfecties beter in kaart kunnen brengen aan de hand van het voorkomen van hantavirussen bij knaagdieren. Deze voorbeelden onderschrijven het belang van het verkrijgen van een beter inzicht in de rol die knaagdieren spelen in de transmissie van zoonosen. Het onderzoek aan knaagdieren en zoonosen is in opdracht van de NVWA gestart in 2008 en is in 2014 door het Ministerie van VWS overgenomen. In de opdrachtbrief van VWS van 2014 staat het als volgt geformuleerd onder het thema Zoonosen en vectorgebonden infecties: Ik verzoek u zorg te dragen voor het monitoren van en adviseren over de belangrijkste vectorgebonden zoonosen en bij knaagdieren en plaagdieren voorkomende zoonosen op basis van de Emzoo-lijst.

In dit onderzoek wordt onderzocht welke zoonotische ziekteverwekkers circuleren in wilde knaagdieren in Nederland, ten behoeve van het verkrijgen van een beter inzicht in de epidemiologie van parasitaire, bacteriële en virale zoonosen in Nederland. Dit is noodzakelijk voor de ontwikkeling van adequate strategieën ter bescherming van de volksgezondheid. Binnen de opdracht wordt gekeken naar het voorkomen van opduikende en geprioriteerde pathogenen bij knaagdieren om adequaat te kunnen reageren op mogelijke bedreigingen voor de volksgezondheid in Nederland. Deze prioritering is in het verleden gemaakt op basis van de knaagdiersoorten die we in Nederland hebben, welke ziekteverwekkers deze knaagdieren bij zich kunnen dragen en hoeveel risico deze voor mensen zouden kunnen opleveren. Hiervoor is o.a. de lijst met zoonosen gebruikt uit het rapport "Emerging Zoonoses" dat in 2010 door het RIVM is gepubliceerd. Speciale prioriteit hebben rosse woelmuizen, veldmuizen en bruine en zwarte ratten, maar ook andere soorten kunnen van belang zijn indien er bijvoorbeeld nieuwe zoonosen opkomen, of nieuwe informatie beschikbaar komt. Dit project maakt onderdeel uit van lopend onderzoek in opdracht van het Ministerie van VWS, waarbij in het verleden waar mogelijk materialen verzameld voor de biobank. Waar deze materialen kunnen worden gebruikt om retrospectief onderzoeksvragen te beantwoorden, zal dat ook gebeuren. Voorbeelden van een aantal pathogenen waar onderzoek naar wordt/is uitgevoerd: hantavirus (zowel Puumala, Tula en Seoul hantavirus), Leptospira spp., Trichinella spp., Coxiella burnetti en Yersinia pestis. Indien mogelijk/nodig worden de aangetroffen pathogenen nader getypeerd/fylogenetisch geklassificeerd om bijvoorbeeld meer inzicht in de verspreiding te krijgen. Daarnaast worden waar mogelijk risicokaarten gemaakt van de knaagdieroverdraagbare pathogenen.

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?

De algemene doelstelling van dit project is het verwerven van een beter inzicht in de circulatie van en de epidemiologie van parasitaire, bacteriële en virale zoönosen bij wilde knaagdieren in Nederland, hetgeen noodzakelijk is voor de ontwikkeling van adequate strategieën ter bescherming van de volksgezondheid. Concreet willen wij de volgende vragen beantwoorden met het onderzoek: Welke zoönotische (parasitair, bacterieel, virus) pathogenen komen voor bij de wilde knaagdieren in Nederland? Hoe veranderen de prevalentie en/of verspreidingsgebied van deze zoönotische pathogenen? Wat is het risico hiervan voor de humane gezondheid?
Soms zijn er vragen specifiek gericht op de onderzoekslocatie, bijvoorbeeld: is er introductie van niet-endemische zoönosen via import van ratten (havengebieden) en hoe monitoren we dit?

3.3 Belang

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

Dit onderzoek naar knaagdieroverdraagbare pathogenen maakt deel uit van het knaagdieronderzoek dat bij onze organisatie wordt uitgevoerd in opdracht van het Ministerie van VWS, om meer te weten over zoönosen bij wilde knaagdieren in Nederland. Op basis van gegevens verzameld in dit project, eventueel gecombineerd met patiëntgegevens, kunnen risico-analyses gemaakt worden voor de risico's voor de volksgezondheid van de wilde knaagdierenpopulaties in Nederland, al dan niet gecorrigeerd aan bepaalde regio's. Op basis hiervan kunnen gerichte interventiestrategieën opgezet worden om de zoönotische overdracht van deze pathogenen uit de dierreservoirs te reduceren. Zo is bijvoorbeeld al gerichte informatie naar muskusrattenbestrijders gestuurd over leptospirose (ziekte van Weil) en recentelijk ook Seoulvirus, naar aanleiding van onderzoeksresultaten waarbij een hoge prevalentie van Leptospira spp. werd gevonden. Uitkomsten worden zoveel mogelijk teruggekoppeld naar relevante partners in het veld: GGD, Waterschappen, etc.

Naast interventiemogelijkheden en publieksvoorlichting zal het onderzoek ook resulteren in wetenschappelijke output. Resultaten worden jaarlijks aan de opdrachtgever gerapporteerd en zijn tot nu toe deels al gepubliceerd, bv:

Reusken C, van der Plaats R, Opsteegh M, de Bruin A, Swart A, Coxiella burnetii (Q fever) in Rattus norvegicus and Rattus rattus at livestock farms and urban locations in the Netherlands; could Rattus spp. represent reservoirs for (re)introduction? Preventive Veterinary Medicine, 2011, 101(1-2):124-130

Franssen, Frits, Arno Swart, Frans van Knapen, and Joke van der Giessen. "Helminth parasites in black rats (Rattus rattus) and brown rats (Rattus norvegicus) from different environments in the Netherlands." Infection ecology & epidemiology 6 (2016).

de Vries, A., H. Vennema, D. L. Bekker, M. Maas, J. Adema, M. Opsteegh, J. W. B. van der Giessen, and C. B. E. M. Reusken. "Characterization of Puumala hantavirus in bank voles from two regions in the Netherlands were human cases occurred." Journal of General Virology (2016).

A.N. Swart, D. L. Bekker, M. Maas, A. de Vries, R. Pijnacker, C. B. E. M. Reusken, J. W. B. van der Giessen (2017), Modelling Human Puumala Hantavirus Infection in Relation to Bank Vole Abundance and Masting Intensity in the Netherlands. Geaccepteerd voor publicatie in "Infection ecology and epidemiology"

Miriam Maas, Ankje de Vries, Annika van Roon, Katsuhisa Takumi, Joke van der Giessen, and Barry Rockx (2017). High Prevalence of Tula Hantavirus in Common Voles in The Netherlands. Geaccepteerd voor publicatie in "Vector-borne and zoonotic diseases" DOI: 10.1099/vbz.2016.1995

3.4 Onderzoeksstrategie

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

3.4 Onderzoeksstrategie

Idealiter wordt een landelijk overzicht verkregen voor alle hoogst geprioriteerde zoönose-knaagdiergastheer combinaties. Dit is echter logistiek en budgetair niet mogelijk. Daarom worden locaties geselecteerd. De locaties waar knaagdieren worden onderzocht hangen af van de knaagdiersoort en van het pathogeen en de bijbehorende vraagstelling. Bijvoorbeeld: toen in 2013 de vraag bestond of de bacterie *Yersinia pestis* door zwarte ratten kan worden meegenomen vanuit andere landen met zeevaartschepen, is specifiek de zwarte rattenuitvoering in de Amsterdamse haven onderzocht. En toen een longitudinale studie voor Puumala hantavirus werd opgezet, is een locatie gekozen in een regio waar jaarlijks de meeste hantaviruspatiënten zijn, op een plek waar dat jaar ook nog een patiënt was geweest. De knaagdieren worden gevangen door professionals. Voor de ratten is dit meestal [redacted] of een ander ecologisch onderzoeksbureau dat ervaring heeft met het vangen van muizen. Er wordt altijd naar gestreefd de stress voor de dieren tot een minimum te beperken. Ratten worden na het vangen meestal naar het onderzoeksinstituut gebracht, terwijl biotechnische handelingen voor de muizen vaak op locatie worden uitgevoerd. Het uitvoeren van het onderzoek op locatie zorgt ervoor dat de dieren minder stress hebben, en ze eventueel terug kunnen worden gezet. Dit laatste is bij ratten niet wenselijk, omdat het plaagdieren zijn.

Dieren worden verdoofd voor de handelingen. Afhankelijk van de vraagstelling en de geplande diagnostiek wordt bij het levende dier bloed afgenomen, waarna het dier (als het weer wakker is), de natuur weer in mag. Andere keren moeten organen worden verzameld en dan wordt het dier geëuthanaseerd. Bij de sectie worden verschillende organen verzameld, waarbij een deel direct wordt gebruikt voor de vervolgdagnostiek zoals die voor het onderzoek nodig is, en een deel wordt opgeslagen in de biobank voor toekomstige onderzoeken. Dit beperkt het aantal dieren dat nodig is voor het beantwoorden van toekomstige onderzoeksvragen.

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

Er bestaan in dit onderzoek 4 grote hoofdlijnen: monitoring van rattenpopulaties, monitoring van pathogenen in rattenpopulaties, monitoring van muizenpopulaties en monitoring van pathogenen in muizenpopulaties. Voor het monitoren van de pathogenen worden dierproeven gebruikt. Voor de ratten bestaat dit uit het uitvoeren van secties op ons onderzoeksinstituut op ratten die door een professionele plaagdierbestrijder zijn gevangen. Voor de muizen bestaat dit uit het veelal uitvoeren van veldwerk op locatie, waarbij de muizen ofwel gesampled worden en weer worden teruggezet, ofwel worden geëuthanaseerd voor sectie.

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 knaagdierensoorten en de pathogenen die worden onderzocht, worden gekozen op basis van ziektebelasting bij mensen en het risico dat zij kunnen vormen voor de volksgezondheid. Leidraad is hierbij de in 2010 gepubliceerde Emerging Zoonoses lijst. Ieder jaar wordt bepaald welke combinatie het meest relevant is om te bestuderen. Indien mogelijk, wordt hierbij gebruik gemaakt van de biobank die de afgelopen jaren is opgezet. Voor sommige pathogenen worden meerjarige onderzoeken gestart.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Testen muizen/kleine knaagdieren op zoönotische ziekteverwekkers
2	Testen ratten op zoönotische ziekteverwekkers



Centrale Commissie Dierproeven i.o.

Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	Volgnummer 1	Type dierproef Testen muizen/kleine knaagdieren op zoönotische ziekteverwekkers

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Afhankelijk van de vraagstelling worden een locatie en knaagdiersoort gekozen om het onderzoek op te richten. Hierop wordt dan een geschikte biotoop uitgekozen. Eventueel worden meerdere knaagdiersoorten meegenomen in het onderzoek: in 2014 is bijvoorbeeld naar TBE gekeken, wat bij meerdere knaagdiersoorten wordt aangetroffen, vandaar dat alle gevangen soorten werden onderzocht. Als echter een vraagstelling zich richt op een pathogeen dat specifiek bij 1 knaagdiersoort voorkomt (zoals bijvoorbeeld Dobrava-belgrade virus bij de grote bosmuis), dan worden andere knaagdiersoorten vrijgelaten. Onze ervaring is, dat als men specifiek in één biotoop vangt, men in het algemeen slechts enkele dieren van de andere soorten vangt.

De gevangen dieren zullen worden onderzocht op het voorkomen van verschillende parasitaire, bacteriële en virale zoonotische pathogenen. Dit zal ons helpen gericht advies over risico's voor menselijke besmettingen te geven en kan dienen als motivatie voor het nemen van maatregelen.

Het doel van dit onderzoek is het in kaart brengen van aanwezige zoönosen bij wilde knaagdieren (wildvang), en daarom is er geen sprake van een experimentele groep, of een controlegroep (meestal).

Primaire uitkomsten van het onderzoek zijn aan-en afwezigheidsgegevens en prevalentiecijfers van pathogenen bij wilde knaagdieren. Waar mogelijk en relevant wordt ook moleculair naar fylogenie van de ziekteverwekkers gekeken, om bijvoorbeeld patronen van verspreiding over Nederland te achterhalen.

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.

Vangmethoden:

Het vangen van de dieren wordt uitgevoerd door medewerkers van [REDACTED] of een ander ecologisch onderzoeksbureau dat ontheffing heeft voor het uitvoeren van vangstrategieën voor specifieke knaagdiersoorten in hun specifieke biotopen. Er wordt gevangen met Longworth life-traps. De uitgezette vallen worden iedere 12 uur gecontroleerd (ochtend (O) en avond controle (A)) en ze worden voor maximaal 48 uur geplaatst. Dit komt dan neer op 4 vangcontroles per 48 uur. De aangetroffen dieren worden ter plekke gedetermineerd waarna ze óf vrijgelaten worden (Vrijlatingscriteria: Vrijlating van zichtbaar drachtige of lacterende muizen, complete gezinnen, exemplaren die boventallig zijn) óf gebruikt worden voor onderzoek. De bij de avondcontrole aangetroffen dieren worden in kooitjes met hooi, eten en water gehouden op een verzamelplek tot de analyse de volgende ochtend.

De biotech handelingen worden de eerstvolgende dag uitgevoerd.

Ter verduidelijking:

A1 en O2 > biotech handelingen.

A3 en O4 > biotech handelingen.

Bijvoorbeeld: een muis kan om 13 uur 's middags worden gevangen. Hij wordt dan in de avondcontrole gevonden en in een kunstofbak met hooi en water gezet. De volgende ochtend/dag (afhankelijk van het aantal gevangen dieren) wordt hij onderzocht/geëthanaseerd. Een dier dat om 23 uur in de val loopt, zal in de ochtendcontrole worden gevonden en worden overgezet en meteen die dag worden geëthanaseerd. In het algemeen kan dus worden gesteld dat een dier max. 24 uur gevangen zal zitten (tijd in vangkooi en kunstofbak samen).

Per soort zullen maximaal 50 dieren geëthanaseerd worden per vangsessie om materiaal voor onderzoek naar de verschillende pathogenen te verzamelen. De ervaring leert dat dit een heel ruime schatting is.

Handelingen:

Gevangen muizen die niet voldoen aan de vrijlatingscriteria worden na identificatie verdoofd waarna bloed wordt afgenomen. Afhankelijk van het pathogeen dat wordt onderzocht, worden de dieren teruggeplaatst in de kooi om wakker te worden en vervolgens losgelaten te worden op hun vangplek, of geëthanaseerd. Organen worden geprepareerd en opgeslagen. Alle materialen worden naar het instituut overgebracht voor verder onderzoek. Als er op de muizen teken of vlooiën worden aangetroffen worden deze verwijderd en ook meegenomen.

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

De prevalentie van de zoönotische pathogenen in Nederlandse knaagdiersoorten waarop deze studie zich richt is vaak onbekend. Van bijvoorbeeld Puumala hantavirus weten we dat het in bepaalde regio's voorkomt en welke prevalenties er voorheen zijn gevonden, maar van andere pathogenen is dat niet bekend. Onlangs is bijvoorbeeld TBE virus vastgesteld in Nederlandse teken, maar of dit ook betekent dat het bij knaagdieren kan worden gevonden, en of zij een rol spelen in de transmissie van TBE virus, is onbekend. Verder waren er bijvoorbeeld vanuit knaagdieronderzoek uit het verleden (serologie) en uit de literatuur vermoedens dat veldmuizen in Nederland Tula hantavirus bij zich zouden kunnen dragen. Dit is bevestigd tijdens studies van 2014 en 2015, maar de prevalenties die in de verschillende populaties waren gevonden, waren veel hoger dan verwacht. Dit geeft aan dat het lastig is om steekproefgroottes te bepalen op basis van beschikbare prevalenties. Ook is de populatiegrootte van de knaagdiersoorten altijd onbekend, wat het niet mogelijk maakt een steekproefgrootte te berekenen zoals dat gebeurt bij experimenteel onderzoek. Het is daarom gebruikelijk in dit onderzoeksveld om een studie naar het voorkomen van zoönotische pathogenen in kleine knaagdiersoorten waarbij er geen kennis voorhanden is over de te verwachten positieve aantallen, te starten met een onderzoek waarbij per vanglocatie, indien mogelijk, 50-100 knaagdieren bemonsterd worden. Dit is vastgesteld in overleg met experts uit België (), Zweden () en Finland (). Er is gekozen voor een uitgangsaantal van 50 dieren: dit is in de meeste gevallen voldoende om een indicatie te krijgen van het voorkomen van pathogenen, ook bij lagere (enkele procenten) prevalenties van pathogenen. Indien pathogenen worden gevonden, wordt een nieuwe steekproef berekend met mogelijk meer dieren. Wij zijn aan de ondergrens van dit advies gaan zitten, om het aantal dieren in de proef te beperken. Daarbij moet worden opgemerkt dat het wilde dieren betreft en dat dit streefgetallen betreft: omstandigheden als een kleine populatie maken het soms niet mogelijk deze aantallen te halen, ondanks een hoge vanginspanning.

Met WinEpiscope zullen prevalenties met betrouwbaarheidsintervallen worden berekend. Spatio-temporele analyses zullen worden uitgevoerd. Er wordt naar gestreefd om voor relevante zoonosen "Risk maps" te maken.

B. De dieren

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

Species

09 Andere knaagdieren
(andere Rodentia)*

Aantal dieren
gebudgetteerd
600

Onderbouwing

Voor dit onderzoek worden verschillende soorten muizen onderzocht. Dit zullen voornamelijk rosse woelmuizen en veldmuizen zijn, hoewel dit afhankelijk is van de onderzoeksvraag. De prevalentie in Nederlandse knaagdiersoorten van de verschillende pathogenen waarop dit onderzoek zich richt is onbekend. In overleg met experts uit België [redacted] Zweden [redacted] en Finland [redacted], is overlegd te starten met een onderzoek waarbij per vanglocatie, indien mogelijk, 50-100 knaagdieren bemonsterd worden. Wij zijn aan de ondergrens van dit advies gaan zitten, om het aantal dieren in de proef te beperken. Er wordt uitgegaan van 2 vangsessies per jaar, waarbij max 50 muizen worden gevangen. Voor 5 jaar: $2 \times 50 \times 5 = 500$ muizen. In het verleden is echter gebleken dat er soms behoefte is aan extra vangsessies als er bijvoorbeeld verheffingen van knaagdieroverdraagbare infectieziekten bij de mens zijn (bv hantaviruspatienten), of introductie van nieuwe knaagdiersoorten (bv grote bosmuis). Om ruimte te houden om te kunnen reageren op dit soort ontwikkelingen, rekenen we 2 extra vangsessies van 50 muizen. Totaal: $500 + 100 = 600$ muizen. Uit ervaring kan worden gesteld dat het aantal vangsessies en het geschatte totaal aantal dieren heel ruim is en dat zoveel dieren naar alle waarschijnlijkheid niet zullen worden gevangen.

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.

Vermindering: Zoals toegelicht bij de vraag over dieraantallen, wordt gekozen voor maximaal 50 muizen per soort per locatie, met een totaal van 600 muizen over 5 jaar. Wij zijn hierbij op de ondergrens van het advies gaan zitten, om het aantal dieren in de proef te beperken. Gezien de ervaring uit het verleden, zullen niet alle 600 dieren worden gebruikt. Waar mogelijk zullen materialen worden gebruikt die in het verleden zijn verzameld en zijn opgeslagen in de biobank. Vervanging: Omdat de onderzoeksoopdracht van het Ministerie van VWS specifiek is wat het risico is van wilde knaagdieren voor de volksgezondheid, is het niet mogelijk om helemaal geen kleine knaagdieren meer te testen. Echter, waar mogelijk zal gebruik worden gemaakt van materialen die al beschikbaar zijn (bijvoorbeeld dmv de biobank), of van dieren die al voor andere onderzoeken / in het kader van bestrijding zijn gevangen. Dit hebben wij ook zo gedaan voor bijvoorbeeld onderzoek naar Tula hantavirus bij veldmuizen in 2015, en voor Puumala hantavirus bij rosse woelmuizen in 2016. Verfijning: Dieren worden zo kort mogelijk in hun kooi gehouden. Dit is maximaal 24 uur afhankelijk van het moment dat de muis is gevangen, maar (zie toelichting A2). Het werk wordt op locatie uitgevoerd, zodat dieren niet vervoerd hoeven te worden. In de periode dat ze gevangen zijn, worden ze voorzien van nestmateriaal en eten.

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 stress van de dieren wordt zoveel als mogelijk beperkt door professionele vangers te vragen dit onderdeel uit te voeren. Zij verzorgen ook adequate behuizing met nestmateriaal en eten voor de periode dat de dieren gevangen zitten. Als de proef het toelaat, als bijvoorbeeld alleen bloed hoeft te worden afgenomen, worden de dieren na het testen weer teruggezet op de plek waar ze zijn gevonden.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

De dierproeven zijn niet eerder uitgevoerd op deze locaties onder deze omstandigheden. Het knaagdierenonderzoek loopt weliswaar sinds 2008, en deels vinden studies op dezelfde locaties plaats, maar het gaat in die gevallen om het onderzoeken van longitudinale ontwikkelingen.

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?

F. Huisvesting en verzorging

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.

Deze proefopzet betreft wilde knaagdieren, die zo kort mogelijk in gevangenschap worden gehuisvest.

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.

De locatie waar het onderzoek wordt uitgevoerd verschilt per onderzoeksvraag. In ieder geval betreft het meestal landelijke omgevingen, maar wel in de nabijheid van mensen.

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

Het betreft wilde knaagdieren. De onderzoeksvraag is of daarbij op een bepaalde locatie bepaalde pathogenen voorkomen in die populatie (of vergelijkbare vragen). Om dat te weten zal op de locatie zelf moeten worden getest. Er wordt meestal gekozen dat werk ter plekke uit te voeren, om stress van vervoer te vermijden en de tijd in de kooi zo kort mogelijk te houden. Als de onderzoeksvraag het toelaat, worden de dieren teruggeplaatst.

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 dieren worden tijdelijk in kooien gehouden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Ze moeten gevangen worden in kooien.

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

De tijd dat ze in een kooi zitten wordt zo kort mogelijk gehouden. In de kooi is voedsel en nestmateriaal aanwezig.

H. Pijn en pijnbestrijding

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Licht ongerief voor de anesthesie en matig ongerief voor het transport en gevangenschap

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Afhankelijk van het onderzoek worden de dieren geëuthanaseerd: dit hangt af van het pathogeen waar naar wordt gekeken. Als hier een snelst voor beschikbaar is die ook op locatie kan worden uitgevoerd (bv Puumala hantavirus) dan wordt dat gedaan en worden bijvoorbeeld alleen de positieve dieren geëuthanaseerd en een beperkt aantal negatieve als controlegroep. Echter, als het nodig is voor diagnostiek om organen te verzamelen (bv leptospirose), dan worden de dieren geëuthanaseerd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

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: **Zoönotische pathogenen bij wilde knaagdieren**
3. Titel van de NTS: **Knaagdieroverdraagbare ziekteverwekkers bij wilde knaagdieren**
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: **30-3-2017**
aanvraag compleet
in vergadering besproken: **06-04-2017 en 04-05-2017**
anderszins behandeld
termijnonderbreking(en) van / tot **10-24 mei 2017 + 8-9 mei 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 kan met de projectaanvraag instemmen.
8. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum:
 - Plaats: **Bilthoven**
 - Aantal aanwezige DEC-leden: **5**
 - Aanwezige (namens) aanvrager: **projectleider / art. 9**
 - Gestelde vraag / vragen:
Aanvrager is verzocht om de context van de aanvraag ten behoeve van de DEC nader toe te lichten
 - Verstrekt(e) antwoord(en):
Aanvrager heeft een heldere presentatie gehouden en na afloop enkele informatieve vragen beantwoord.

- Het horen van de aanvrager heeft wel/**niet** geleid tot aanpassing van de aanvraag:

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **10-04-2017**
- Gestelde vraag/vragen:

Project:

1. Zoals besproken in de vergadering zou de DEC willen vragen na te gaan of er een ontheffing is op de "Wet natuurbescherming".
2. Tijdens de presentatie is aangegeven dat er een opdracht is vanuit de overheid om dit onderzoek uit te voeren. Zouden jullie deze opdracht duidelijker kunnen omschrijven in de projectaanvraag?

Bijlage 1 en 2:

3. In de bijlages wordt onder "verfijning" aangegeven dat de dieren zo kort mogelijk in gevangenschap worden gehouden voordat er of ter plekke bloed wordt afgenomen of de dieren worden vervoerd. Graag nagaan wat in het verleden de gemiddelde periode is geweest die de dieren gevangen hebben gezeten en deze informatie verwerken in de bijlages.
4. Onder "vervanging" wordt aangegeven dat dierexperimenten noodzakelijk zijn omdat dit intrinsiek besloten ligt in de opdracht van het ministerie van VWS. Zou het echter mogelijk zijn om een deel van de vraagstelling(en) te beantwoorden zonder proefdieren bijv. door het voorkomen van zoönose te bepalen in oppervlakte water of uitwerpselen van knaagdieren (dit zijn ten slotte ook de routes waarlangs mensen besmet worden)?
5. In de bijlages wordt aangegeven dat het aantal dieren per vangsessie/locatie maximaal 50 dieren bedraagt. Waarop is dit aantal gebaseerd? Graag onderbouwen door middel van een berekening of literatuur.

- Datum antwoord: **24-04-2017**
- Verstrek(e) antwoord(en):

Ad 1. Indien het onderzoek wordt gedaan bij wilde muizen, dan worden de wilde muizen gevangen door [REDACTED]. Zij hebben de benodigde kennis, ervaring en ontheffing in het kader van de wet Natuurbescherming. [REDACTED] heeft 18 april 2017 een nieuwe ontheffing ontvangen. [REDACTED] voor het tijdvak van: 14 april 2017 tot en met 13 april 2022".

Ad 2. 3.1 Achtergrond

Toegevoegd: In 2010 bleek uit het Emerging Zoonoses rapport dat bij veel opkomende zoönosen knaagdieren een rol spelen, maar dat er weinig bekend is over de zoönosen die bij in Nederland voorkomende wilde knaagdieren kunnen voorkomen. Wat bijvoorbeeld de rol van ratten is geweest bij de toename van autochtone leptospirose patiënten in 2014 en 2015, of hoe we de risico's voor het oplopen van Hantavirusinfecties beter in kaart kunnen brengen aan de hand van het voorkomen van hantavirussen bij knaagdieren. Deze voorbeelden onderschrijven het belang van het verkrijgen van een beter inzicht in de rol die knaagdieren spelen in de transmissie van zoönosen. Het onderzoek aan knaagdieren en zoönosen is in opdracht van de NVWA gestart in 2008 en is in 2014 door het Ministerie van VWS overgenomen. In de opdrachtbrief van VWS van 2014 staat het als volgt geformuleerd onder het thema Zoönosen en vectorgebonden infecties: Ik verzoek u zorg te dragen voor het monitoren van en adviseren over de belangrijkste vectorgebonden zoönosen en bij knaagdieren en plaagdieren voorkomende zoönosen op basis van de Emzoo-lijst.

Ad 3.

Bijlage muizen:

A2 Dierbehandeling: Volgens mij staat het hier al duidelijk:

Vangmethoden:

Het vangen van de dieren wordt uitgevoerd door medewerkers van de [REDACTED] of een ander ecologisch onderzoeksbureau dat ontheffing heeft voor het uitvoeren van vangstrategieën voor specifieke knaagdiersoorten in hun specifieke

biotopen. Er wordt gevangen met Longworth life-traps. De uitgezette vallen worden iedere 12 uur gecontroleerd (ochtend (O) en avond controle (A)) en ze worden voor maximaal 48 uur geplaatst. Dit komt dan neer op 4 vangcontroles per 48 uur. De aangetroffen dieren worden ter plekke gedetermineerd waarna ze óf vrijgelaten worden (Vrijlatingscriteria: Vrijlating van zichtbaar drachtige of lacterende muizen, complete gezinnen, exemplaren die boventalig zijn) óf gebruikt worden voor onderzoek. De bij de avondcontrole aangetroffen dieren worden in kooitjes met hooi, eten en water gehouden op een verzamelplek tot de analyse de volgende ochtend.

De biotech handelingen worden de eerstvolgende dag uitgevoerd.

Ter verduidelijking:

A1 en O2 > biotech handelingen.

A3 en O4 > biotech handelingen.

Bijvoorbeeld: een muis kan om 13 uur 's middags worden gevangen. Hij wordt dan in de avondcontrole gevonden en in een kunstofbak met hooi en water gezet. De volgende ochtend/dag (afhankelijk van het aantal gevangen dieren) wordt hij onderzocht/geëuthanaseerd. Een dier dat om 23 uur in de val loopt, zal in de ochtendcontrole worden gevonden en worden overgezet en meteen die dag worden geëuthanaseerd. In het algemeen kan dus worden gesteld dat een dier max. 24 uur gevangen zal zitten (tijd in vangkooi en kunstofbak samen).

Bij D1 3 v's : verfijning extra toegelicht:

Verfijning: Dieren worden zo kort mogelijk in hun kooi gehouden. Dit is maximaal 24 uur afhankelijk van het moment dat de muis is gevangen, maar (zie toelichting A2). Het werk wordt op locatie uitgevoerd, zodat dieren niet vervoerd hoeven te worden. In de periode dat ze gevangen zijn, worden ze voorzien van nestmateriaal en eten. Bijlage 2 ratten

A2 Dierbehandeling

Oude tekst vervangen door: De gevangen ratten worden in hun vangkooi op de verzamellocatie gehouden voordat ze naar het instituut worden vervoerd voor de biotechnische handelingen zoals hieronder beschreven. Ervaring uit het verleden leert dat minimaal 90% van de ratten in de praktijk vaak op dezelfde dag, of een dag later naar het instituut worden vervoerd. De bestrijder rijdt namelijk meerdere keren per week door Nederland om de verblijfsduur van de ratten in de kooien zo kort mogelijk te houden. In bijzondere gevallen, als het niet anders kan, dan kan het voorkomen dat enkele dieren wat langer in hun vangkooi op de verzamellocatie gehouden worden voor ze naar het instituut gebracht worden. Voor deze uitzonderingen houden wij een periode van maximaal 7 dagen aan waarin de ratten in hun vangkooi op de verzamellocatie gehouden kunnen worden. Op het instituut worden ze dezelfde dag nog geëuthanaseerd en worden de biotechnische handelingen uitgevoerd.

D1 3 v's: verfijning extra toegelicht

Oude tekst vervangen door: Daarnaast wordt ernaar gestreefd de dieren zo kort mogelijk in de kooi te houden, en zoals eerder aangegeven leert de ervaring uit het verleden dat 90% van de ratten binnen een of twee dagen op het RIVM kunnen worden onderzocht.

Ad 4. De onderzoeksoopdracht van het Ministerie van VWS is: Wat is het risico van wilde knaagdieren voor de volksgezondheid? Door water of ontlasting te testen kunnen wij deze vraag niet beantwoorden. Voor bijv. leptospirose is de rat het reservoir dier, dus is onderzoek het meest nuttig en betrouwbaar door ratten te

testen. In water kan leptospirose niet gemeten worden omdat het te ver verdund wordt.

Meet je een pathogeen niet in water, dan zegt dit nog niet dat het geen risico is voor de mens en ook niet over het voorkomen van het pathogeen in knaagdieren. Het voorkomen van zoonosen bepalen in uitwerpselen van dieren is in dit geval ook niet mogelijk. Bijvoorbeeld hantavirussen zijn wel aan te tonen in ontlasting, maar je hebt dan geen idee van welk soort dier je ontlasting onderzoekt (geen reservoirdier zoals rosse woelmuis, bosmuis, spitsmuis etc.), daarnaast is ontlasting van knaagdieren moeilijk te vinden in het veld en weet je ook niet hoe lang het er al ligt en hoe betrouwbaar de resultaten zullen zijn.

Ad 5. De prevalentie van de zoönotische pathogenen in Nederlandse knaagdiersoorten waarop deze studie zich richt is vaak onbekend. Ook is de populatiegrootte van de knaagdiersoorten altijd onbekend, wat het niet mogelijk maakt een steekproefgrootte te berekenen zoals dat gebeurt bij experimenteel onderzoek. Het is daarom gebruikelijk in dit onderzoeksveld om een studie naar het voorkomen van zoönotische pathogenen in kleine knaagdiersoorten waarbij er geen kennis voorhanden is over de te verwachten positieve aantallen, te starten met een onderzoek waarbij per vanglocatie, indien mogelijk, 50-100 knaagdieren bemonsterd worden. Dit is vastgesteld in overleg met experts uit België (), Zweden () en Finland (). Er is gekozen voor een uitgangsaantal van 50 dieren: dit is in de meeste gevallen voldoende om een indicatie te krijgen van het voorkomen van pathogenen, ook bij lagere (enkele procenten) prevalenties van pathogenen.

- Datum: **08-05-2017**

- Reactie DEC n.a.v. antwoorden:

Opmerking DEC n.a.v. antwoord op vraag 3:

In het uitzonderlijke geval (<10%) dat de dieren langer dan één à twee dagen op de verzamellocatie in een vangkooi gehouden moeten worden, voordat ze naar het instituut gebracht kunnen worden, vraagt de DEC zich af of deze dieren niet beter geëuthanaseerd kunnen worden. Er kunnen toch ook dieren uit een volgende vangstronde gebruikt worden die wel dezelfde of de volgende dag gebracht kunnen worden?

Opmerking DEC n.a.v. antwoord op vraag 5:

Dit antwoord geeft geen nieuwe informatie in vergelijking met de oorspronkelijke aanvraag. Deskundigen adviseren dat het bemonsteren van 50-100 dieren voldoende is, maar het wordt nog steeds niet duidelijk op basis van welke overwegingen zij dat adviseren. Zijn hier publicaties over waarin dat, bijvoorbeeld met een berekening, onderbouwd wordt? Ook blijft onduidelijk waarom u aan de onderkant van de range gaat zitten (50 dieren). Veel hangt af van de vraag welke kans dat er wel pathogenen aanwezig zijn in de populatie, maar dat u ze niet aantreft, u (of uw opdrachtgever) nog aanvaardbaar vindt.

- Datum antwoord: **09-05-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

Reactie onderzoeker op opmerking DEC n.a.v. antwoord vraag 3:

Wij vangen levende dieren om zo onderzoek van goede kwaliteit te kunnen doen op de organen en om serum te kunnen verkrijgen. Euthanasie zou voorbij gaan aan het doel van het onderzoek. Euthanasie ter plekke is niet mogelijk omdat wij niet ter plekke zijn en degene die de ratten vangen dat niet kunnen doen. Daarnaast zal het voornamelijk op locaties waar ratten moeilijk gevangen kunnen worden een enkele keer voorkomen dat de dieren langer dan 1 a 2 dagen moeten wachten voordat ze naar het RIVM vervoerd worden. Als wij dan ook nog een deel van de dieren euthanaseren en niet meenemen in het onderzoek, komen we niet aan de gewenste aantallen.

Reactie onderzoeker op opmerking DEC n.a.v. antwoord vraag 5:

50 dieren, dat is gebaseerd op ervaring van experts en naast de gegeven argumentatie, pragmatisch. Het is onmogelijk om steekproeven te berekenen omdat 1. de populatiegrootte onbekend is bij wildlife en 2. de prevalenties niet bekend zijn

in wildlife. Deze getallen zijn dus op basis van al beschreven argumentatie vastgesteld en de ondergrens is zuiver pragmatisch. Meer dieren is vaak onmogelijk om te verkrijgen. Zo zijn we in Friesland wel 3 jaar bezig geweest om 50 ratten te verzamelen.

- Datum: **15-05-2017**

- Reactie DEC n.a.v. antwoorden:

Het antwoord op vraag 3 is akkoord bevonden. N.a.v. het antwoord op vraag 5, verzoekt de DEC om 1 of 2 publicaties te noemen waarin wordt aangegeven dat 50-100 dieren een goed aantal is voor deze inventarisaties.

- Datum antwoord: **29-05-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

Zoals eerder aangegeven, is de 50-100 dieren op basis van expert elicitations met andere knaagdieronderzoekers vastgesteld. Sindsdien hebben wij dit aangehouden. Dit was ook al zo bij de vorige DEC aanvraag. In de literatuur van de experts uit België, Zweden en Finland staat niet expliciet dit aantal genoemd, maar wordt het als streven aangehouden. Voor de pathogenen waar wij nu naar kijken, lijkt dit goed te werken. Uiteindelijk onderzoeken wij de dieren om een inschatting te maken van het risico voor de volksgezondheid. Voor leptospirose en SEOV krijgen wij op basis van deze aantallen een redelijk inzicht in het voorkomen en prevalentie. Op basis daarvan worden de data gebruikt in risicomodellen.

- **De antwoorden zijn akkoord bevonden door de DEC.**

- De antwoorden hebben ~~wel~~niet 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 over dit project 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 en concrete vraagstelling binnen het project met elkaar samenhangen en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. 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. De DEC neemt aan dat er een ontheffing in het kader van de wet natuurbescherming aangevraagd en verleend is, daar de aanvrager dit type onderzoek al langer uitvoert.
3. De in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) "Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier" sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling. Het betreft onderzoek naar "factoren" in het milieu die een bedreiging vormen voor de gezondheid van mens en dier, maar het is geen onderzoek ter bescherming van het milieu in de gebruikelijke betekenis van die term.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het verzamelen van gegevens over de aanwezigheid van zoönitische pathogenen bij wilde knaagdieren in Nederland (prevalentie en verspreiding) om een inschatting te kunnen maken van de risico's die dit met zich meebrengt voor de mens.
Het uiteindelijke doel van het project is het beschermen van de volksgezondheid door op basis van deze gegevens passende beleidsmaatregelen te nemen.
De DEC is van mening dat er een heldere relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden binnen dit onderzoek zijn de proefdieren, de onderzoekers, de burgers (samenleving) en de overheid als opdrachtgever. 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 het vangen, het nemen van (bloed)monsters en de dieren zullen in een aantal gevallen gedood worden. Naar de mening van de DEC hebben de onderzoekers geen persoonlijk belang bij het kunnen uitvoeren van dit onderzoek en speelt dit dus geen rol bij de ethische afweging. De overheid krijgt door dit onderzoek gegevens tot haar beschikking die haar in staat stellen maatregelen te nemen (o.a. adviezen geven) om burgers te beschermen tegen ziekten die kunnen worden overgebracht door wilde knaagdieren. Dit is in het belang van de volksgezondheid.
6. Omdat het in dit project gaat om een zeer beperkt aantal dieren uit het wild, valt er naar de mening van de DEC niet te verwachten dat het voorgestelde onderzoek een nadelig effect zal hebben op het milieu of de natuur. Ook wordt aangegeven dat indien er met de vallen lacterende dieren of hele gezinnen gevangen worden, deze dieren niet gebruikt worden voor het onderzoek, maar teruggezet zullen worden.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoekers en het instituut waar zij werken zijn voldoende gewaarborgd. De aanvragers hebben jarenlange ervaring met het monitoren van zoönitische pathogenen in wilde knaagdieren. 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 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 wel sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren,

omstandigheden of behandeling van de dieren (zie onderstaand de categorieën). Het onderzoek wordt uitgevoerd aan uit het wild gevangen dieren, waarvan sommige diersoorten bedreigd zijn. Dit is gezien de vraagstelling onvermijdelijk. De DEC acht de vraagstelling zeer relevant en is van mening dat het in dit geval ethisch toelaatbaar is om (beschermde) dieren in het wild te vangen en in een aantal gevallen ook te doden. Het is aannemelijk dat de voorgestelde experimenten geen bedreiging vormen voor de soort of voor lokale populaties.

- 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 niet geheel conform de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Dit hangt samen met het feit dat de dieren uit het wild worden gevangen en tijdelijk verblijven in kooien die speciaal bedoeld zijn voor het vangen van de dieren en niet voor langdurige huisvesting. Echter de onderzoekers spannen zich in om het welzijn van de dieren zoveel mogelijk te verbeteren, door gebruikt te maken van grote vangkooien, door het toepassen van kooiverrijking en door het verblijf in de kooien zo kort mogelijk te houden.
11. De aanvragers hebben het cumulatief ongerief van de dieren geschat op matig. Het ongerief dat de dieren ondervinden wordt veroorzaakt door het vangen van de dieren uit het wild, het nemen van monsters en het doden van de dieren. Naar mening van de DEC is het cumulatieve ongerief, matig, als gevolg van de dierproeven juist ingeschat en geclassificeerd.
12. De integriteit van dieren wordt in beperkte mate aangetast door ze (tijdelijk) hun vrijheid te ontnemen en hun natuurlijke gedrag in te perken.
13. Op basis van ervaring, voorzien de aanvragers dat er zich geen omstandigheden voor zullen doen, waarbij het toepassen van humane eindpunten noodzakelijk is. De DEC is van mening dat dit een juiste inschatting is.

3V's

14. De DEC is van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven voorhanden zijn. De vraagstelling is alleen te beantwoorden door wilde knaagdieren te vangen en (bloed)monsters te nemen. Daarnaast is aangegeven, dat daar waar mogelijk, gebruik gemaakt zal worden van materialen die al beschikbaar zijn (bijvoorbeeld in de biobank). Ook zal gebruik worden gemaakt van dieren die worden gevangen in het kader van de plaagbestrijding en die om die reden toch al gedood zouden worden.
15. Om het benodigde aantal dieren goed in te kunnen schatten is het noodzakelijk zowel de incidentie van te onderzoeken ziektes als de populatiegrootte van de wilde knaagdieren te kennen. Aangezien deze informatie niet voorhanden is en wetenschappelijke literatuur op dit gebied ontbreekt, is het aantal dieren dat aangevraagd wordt, gebaseerd op een schattig van deskundigen. De DEC is akkoord met deze schatting, omdat het aantal dieren niet onrealistisch hoog of laag lijkt te zijn.

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 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. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal gebruik maken van de dieren die zij vangt, ongeacht de vraag of het om mannelijke of vrouwelijke dieren blijkt te gaan. De aanvrager heeft geen mogelijkheid om het geslacht van de dieren die worden gevangen te beïnvloeden.

19. De dieren zullen worden gedood met een dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doding is noodzakelijk wanneer organen nodig zijn voor onderzoek of wanneer dieren besmet blijken met voor de mens gevaarlijke pathogenen. Ook dieren die worden gevangen in het kader van de plaagdierbestrijding zullen worden gedood. Alle overige dieren zullen zo veel mogelijk weer worden losgelaten op de plek waar ze gevangen werden.

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 verzamelen van gegevens over de aanwezigheid van zoönitische pathogenen bij wilde knaagdieren in Nederland (prevalentie en verspreiding) om een risico-inschatting te kunnen maken voor de volksgezondheid, het ongerief dat de dieren zullen ondervinden en de integriteitsaantasting van de dieren?

2. De integriteit en het welzijn van de dieren worden in dit project in lichte mate aangetast (zie C9 tot C20). Daar staat tegenover dat dit project bijdraagt aan het kunnen inschatten van de prevalentie en de risico's van zoönoses en het nemen van passende beleidsmaatregelen waardoor de volksgezondheid gewaarborgd kan worden. De DEC kent daar veel gewicht aan toe.

3. De DEC is overtuigd van het belang van het verzamelen van gegevens over de aanwezigheid van zoönitische pathogenen bij wilde knaagdieren in Nederland (prevalentie en verspreiding) om een inschatting te kunnen maken van de risico's die dit met zich meebrengt voor de mens (directe doel) en daarmee de volksgezondheid te beschermen door op basis van deze gegevens passende beleidsmaatregelen te nemen (uiteindelijke doel), en vindt dat de kennis en kunde van de aanvragers het aannemelijk maakt dat deze 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 matig en lichte ongerief dat de dieren ondervinden als

30 maart 2017

gevolg van gevangenschap, anesthesie, bloedafnames, eventueel transport en euthanasie 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. Advies aan de CCD
x **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

Intravacc

T.a.v. [REDACTED]

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
AVD3260020172104

Bijlagen

2

Datum 12 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte mevrouw [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 12 juni 2017. Het gaat om uw project "Zoönotische pathogenen bij wilde knaagdieren". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD3260020172104. 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:

12 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD3260020172104

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
12 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD3260020172104

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 32600
Naam instelling of organisatie: Intravacc
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: ██████████
Postbus: 450
Postcode en plaats: 3720 AL BILTHOVEN
IBAN: NL741NGB0705003612
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: PD Alt

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: Projectleider/onderzoeker
Afdeling: RIVM ██████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Datum:
12 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD3260020172104

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Projectleider/onderzoeker
Afdeling: RIVM [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

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

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juli 2017
Geplande einddatum: 30 juni 2022
Titel project: Zoönotische pathogenen bij wilde knaagdieren
Titel niet-technische samenvatting: Zoönotische pathogenen bij wilde knaagdieren
Naam DEC: DEC ALT
Postadres DEC: Postbus 450 ([REDACTED]) 3720 AL Bilthoven
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:
12 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD3260020172104

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Bilthoven
Datum: 8 juni 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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
AVD3260020172104

Bijlagen

2

Datum 12 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 12 juni 2017

Vervaldatum: 12 juli 2017

Factuurnummer: 172104

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD3260020172104	€ 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

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
AVD3260020172104

Bijlagen

1

Datum 3 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte mevrouw [REDACTED]

Op 12 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Zoönotische pathogenen bij wilde knaagdieren" met aanvraagnummer AVD3260020172104. 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 "Zoönotische pathogenen bij wilde knaagdieren" starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 juli 2017 tot en met 30 juni 2022.

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 12 juni 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:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD3260020172104

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "Zoönotische pathogenen bij wilde knaagdieren" met aanvraagnummer AVD3260020172104, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC ALt. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Projectleider/onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Projectleider verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 12 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per brief op 12 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per brief op 12 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 12 juni 2017, ontvangen op 12 juni 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Testen muizen/kleine knaagdieren op zoönotische ziekteverwekkers				
	Andere knaagdieren (andere Rodentia) / verschillende soorten muizen	600	Matig	
3.4.4.2 Testen ratten op zoönotische ziekteverwekkers				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / <i>Rattus norvegicus</i> of <i>Rattus rattus</i>	600	Matig	

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

Aanvraagnummer:
AVD3260020172104

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:

AVD3260020172104

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 onvereenigbaar 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:

AVD3260020172104

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.

Locatie

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

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
nr.	documenten NTS20172144	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	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Vraag en antwoord aanvraag				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	



1190020172144

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in 11400
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	
KvK-nummer	64156338	
Straat en huisnummer	de Boelelaan	1117
Postbus		
Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam
IBAN		
Tenaamstelling van het rekeningnummer		

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

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

1.4 (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	[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 sept 2017
- Einddatum | 31 aug 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Herstel van lekkende haarvaten om de doorbloeding van organen te verbeteren en orgaanschade te voorkomen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
- Postadres | [REDACTED] Amsterdam | Nederland
- E-mailadres | [REDACTED]

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
		<input type="checkbox"/> Wijziging € Lege
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. <i>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.</i>	<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso
		<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur*
		* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.
		Inkoopordernummer: 4684861 Factuuradres: VU medisch centrum, [REDACTED] De Boelelaan 1117 1081 HV Amsterdam
		Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	<u>Verplicht</u>
		<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel
		<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
		<u>Overige bijlagen, indien van toepassing</u>
		<input checked="" type="checkbox"/> Melding Machtiging
		<input checked="" type="checkbox"/> Bijlage 1 en 2 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 1.7). De ondergetekende verklaart: <ul style="list-style-type: none"> dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn. dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid. dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen. dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag. dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.
		Naam [REDACTED]
		Functie [REDACTED]
		Plaats Amsterdam
		Datum 12-06-2017
		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

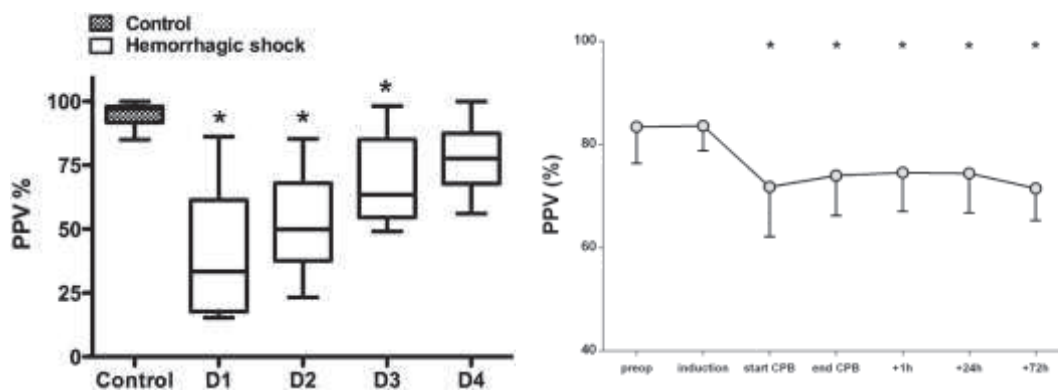
Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

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.

De doorbloeding van de microcirculatie is een belangrijk onderdeel van de bloedsomloop. De microcirculatie bestaat uit de haarvaten (capillairen) waarin de uitwisseling van zuurstof, koolstofdioxide, voedingsstoffen en afvalstoffen met de omliggende organen plaatsvindt. Vermindering van de doorbloeding van deze haarvaten kan leiden tot een tekort aan zuurstof en voedingsstoffen en opstapeling van afvalstoffen in de omliggende weefsels en uiteindelijk tot het falen van de organen.

Een verstoorde doorbloeding van de haarvaten is kenmerkend bij ernstig zieke patiënten. ██████████

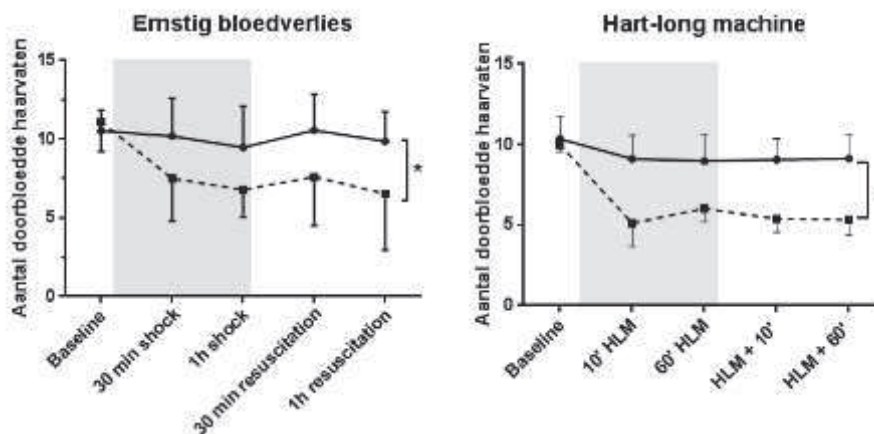
██████████ ██████████ Deze doorbloedingsstoornissen in de haarvaten zijn geassocieerd met het falen van verschillende organen, zoals het acuut falen van de nier (1 op de 7 patiënten) en het acuut falen van de long (1 op de 6 patiënten) en een ongunstige prognose voor de patiënten.



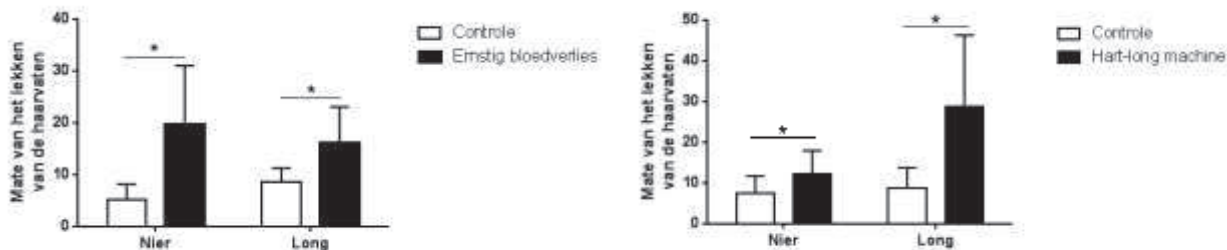
Het **doel** van ons onderzoek is het bestuderen hoe een slechte doorbloeding van de haarvaten kan leiden tot het falen van verschillende organen in ernstig zieke patiënten om vervolgens aangrijpingspunten te vinden en de behandeling te optimaliseren. De huidige behandeling van deze patiënten is gericht op de macrocirculatie, zoals het herstellen van de bloeddruk en de hartslag. Maar juist verstoringen in de microcirculatie (haarvaten) zijn een belangrijke voorspellende factor voor het ontwikkelen van orgaan falen in ernstig zieke patiënten. Helaas bereikt de huidige therapie van deze patiënten nog niet de haarvaten. Met dit onderzoek willen wij nieuwe aangrijpingspunten vinden om de haarvaten te bereiken en de doorbloeding te optimaliseren om uiteindelijk het falen van de organen te verminderen of voorkomen.

Onze onderzoeksgroep heeft eerder laten zien dat de stoornissen in de doorbloeding van de haarvaten in ernstig zieke patiënten gepaard gingen met activatie van de binnenwand van de haarvaten (endotheel), met een dunnere slijm laag over deze binnenwand (glycocalyx) en een verstoorde balans van het moleculaire ██████████ systeem. Tevens hebben celweke experimenten laten zien dat als we humane endotheel cellen blootstellen aan het plasma van deze patiënten de barrière functie verslechtert, wat een indicatie kan zijn dat er markers in het bloed circuleren waardoor de haarvaten gaan lekken. Helaas is het onderliggende mechanisme van de doorbloedingsstoornissen bijna onmogelijk in humaan weefsel te onderzoeken, omdat de huidige technieken om doorbloedingsstoornissen in kaart te brengen nog beperkt zijn. Door deze beperkingen hebben wij ons onderzoek uitgebreid met proefdieren. Wij hebben twee diersmodellen werkend in ons laboratorium welke representatief zijn voor deze ernstig zieke patiënten, ██████████

hebben wij laten zien dat de doorbloeding van de haarvaten verstoord is (zie figuur 2), maar ook niet hersteld kon worden door de huidige behandelingsmethode.



Daarnaast hebben wij laten zien dat deze verstoringen gepaard gingen met het lekken van vloeistof uit de haarvaten in het omliggende weefsel; e.g. vaatlekkage (zie figuur 3).



Eén van de moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten is het moleculaire **VEGF** systeem. Wij hebben aangetoond dat het beïnvloeden van het **VEGF** systeem met een nieuwe medicatie de doorbloeding van de haarvaten herstelt in **ernstig zieke ratten**. Tevens hebben wij laten zien dat deze medicatie het lekken van de haarvaten verminderde. Omdat elk orgaan tijdens stress een andere doorbloeding heeft (bv. vitale organen krijgen voorrang op niet-vitale organen) zullen wij in ons vervolgonderzoek het effect van deze behandeling bestuderen in specifieke organen zoals de longen en de nieren. Daarnaast is bekend dat organen gaan falen binnen 3 dagen **na shock**. Verder onderzoek is daarom nodig om aan te tonen of het beïnvloeden van dit systeem ook op lange termijn effectief is. Hiervoor hebben wij twee beurzen ontvangen.

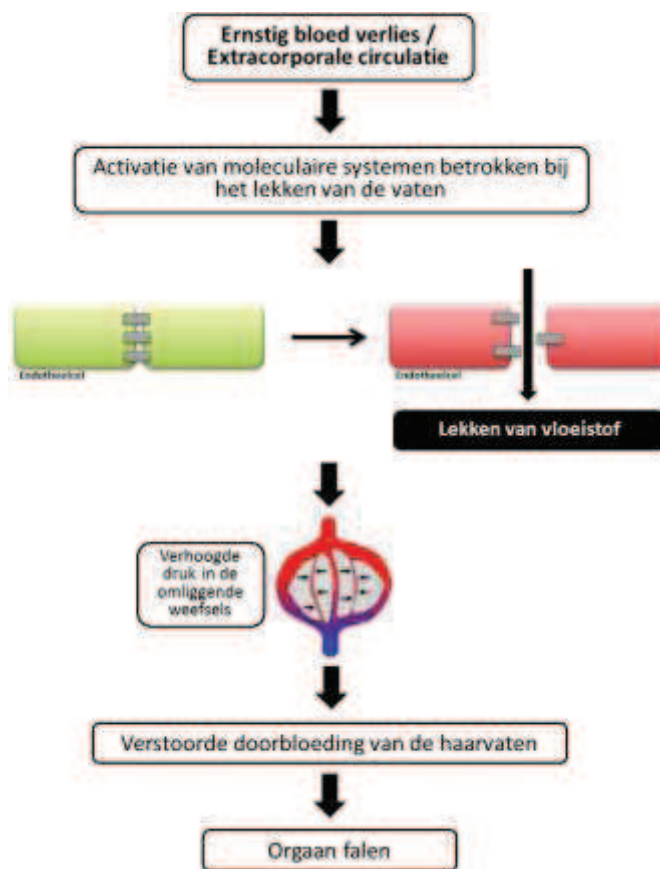
Naast het **VEGF** systeem zijn er ook andere systemen bekend die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten. Het **fundamentele** onderzoek van dit project focust op het ontrafelen van deze systemen met als doel aangrijpingspunten te vinden voor nieuwe medicatie of het toepassen van

bestaande medicatie met een nieuw doel.

Het **translationele** karakter van ons onderzoek is het uiteindelijk toepassen van nieuwe en/of bestaande medicatie met een nieuw doel in de kliniek. Wij hebben al laten zien dat de doorbloeding van de haarvaten verstoord is in ernstig zieke patiënten (zie figuur 1) en twee medicaties waarvan wij de werking hebben laten zien in ratten worden momenteel getest in deze patiënten.

Het **doel** van dit project is het vinden van nieuwe aangrijpingspunten om het lekken van de haarvaten te voorkomen of herstellen en uiteindelijk de doorbloeding van de haarvaten te optimaliseren ter vermindering van orgaan falen.

Hypothese



[REDACTED]

Uiteindelijk wordt het effect van de interventies met de grootste potentie om orgaan falen te verminderen op langere termijn bestudeerd. Ernstig zieke patiënten ontwikkelen de meeste complicaties op de Intensive Care en orgaan falen gemiddeld binnen drie dagen [REDACTED]

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?

Algemene doelstelling

Het vinden van nieuwe aangrijpingspunten om het lekken van de haarvaten te voorkomen of herstellen en uiteindelijk de doorbloeding van de haarvaten te optimaliseren ter vermindering van orgaan falen.

Onderzoeksvragen:

1. Welke moleculaire systemen zijn betrokken bij het lekken van de haarvaten in ernstig zieke dieren?
2. Wat is het effect van het remmen of activeren van de moleculaire systemen gevonden bij vraag 1 op de doorbloeding van de haarvaten en de orgaan functie?
3. Wat is het effect van de bij vraag 2 positief geteste interventies op orgaan functie op de lange termijn?

Haalbaarheid

Binnen onze onderzoeksgroep en ons onderzoeksinstituut is ruime ervaring met de verschillende diermodellen, [REDACTED]

[REDACTED]. Onze kennis over de diermodellen is gedocumenteerd in 7 papers.

De technieken om de doorbloeding en het lekken van de haarvaten te meten worden al met succes toegepast binnen onze onderzoeksgroep. De doorbloeding wordt gemeten met intravitaal microscopie [REDACTED] en contrast echografie in de nieren en het hart. Het lekken van de haarvaten wordt gemeten door middel van uittreding van een blauwe kleurstof vanuit de vaten in de omliggende weefsels. Het meten van het lekken van de vaten, de doorbloeding van de renale haarvaten en de oxygenatie van de nier wordt op het moment uitgebreid met twee-foton microscopie en hyperspectraal imaging in samenwerking met andere onderzoeksgroepen, zowel binnen als buiten ons instituut.

Voor het fundamentele onderzoek hebben wij verschillende technieken werkzaam, zoals PCR, western blotten, immunohistologie, ELISA en celweek, om de veranderingen op RNA en eiwit niveau te bestuderen in de verschillende organen. Het beschreven onderzoek wordt uitgevoerd door 2 promovendi, een postdoc en wordt praktisch ondersteund door een research analist.

Voor het beantwoorden van de hierboven beschreven vraagstellingen hebben wij twee beurzen ontvangen voor het bestuderen van het effect van het lekken van de haarvaten op de doorbloeding van de haarvaten en het ontstaan van orgaan falen [REDACTED]

3.3 Belang

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

Het **wetenschappelijke** belang van dit project is het ontrafelen van moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten voor het vinden van nieuwe aangrijpingspunten om de doorbloeding van de haarvaten te optimaliseren ter vermindering van orgaan falen. Voorheen hebben wij laten zien dat het [REDACTED] systeem verstoord is in ernstig zieke dieren en dat modulatie van dit systeem het lekken en de doorbloeding van de haarvaten verminderde. Deze basis geeft ons aanknopingspunten om de effecten van modulatie van het [REDACTED] systeem te bestuderen op orgaan falen in ernstig zieke dieren met een methode die nog niet eerder uitgevoerd is. Inzicht in de betrokken moleculaire systemen en het vergroten van de kennis over veranderingen in de microcirculatie is essentieel omdat verstoringen in de microcirculatie een belangrijke voorspellende factor zijn voor het ontwikkelen van orgaan falen in ernstig zieke patiënten. Deze kennis kan een belangrijke bijdrage leveren voor nieuwe targets voor medicatie om orgaan falen te verminderen in ernstig zieke patiënten.

Het **maatschappelijke** belang van deze studie ligt in het bijdragen van kennis voor het optimaliseren van de behandeling van ernstig zieke patiënten met verstoringen in de doorbloeding van de haarvaten. Op dit moment is de behandeling van ernstig zieke patiënten gericht op het herstellen van de macrocirculatie (o.a. bloeddruk, hartslag). Echter, er zijn er geen effectieve therapieën beschikbaar die aangrijpen op de microcirculatie, terwijl de laatste jaren gebleken is dat juist verstoringen in de microcirculatie belangrijk zijn voor het ontwikkelen van orgaan falen (15% acuut nier falen, 16% acuut long falen) in ernstig zieke patiënten, [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] Met behulp van deze diermodellen ontrafelen we niet alleen aangrijpingspunten voor therapieën, maar zullen we ook potentiële nieuwe therapieën testen die mogelijk in de kliniek gebruikt kunnen gaan worden. Met deze nieuwe therapieën willen wij de kans op orgaan falen en overlijden van ernstig zieke patiënten verlagen.

De beschreven diermodellen zullen hierbij van belang zijn omdat zij vertaalbaar zijn naar de humane situatie. Wij hebben aangetoond dat in onze diermodellen dezelfde veranderingen plaatsvinden in de doorbloeding van de haarvaten en veranderingen van markers in het bloed als in ernstig zieke patiënten (zie ook figuur 1 en 2). Daarnaast worden momenteel twee medicaties waarvan wij de werking hebben laten zien in ratten getest in ernstig zieke patiënten, wat de extrapolatie van het project ondersteund.

3.4 Onderzoeksstrategie

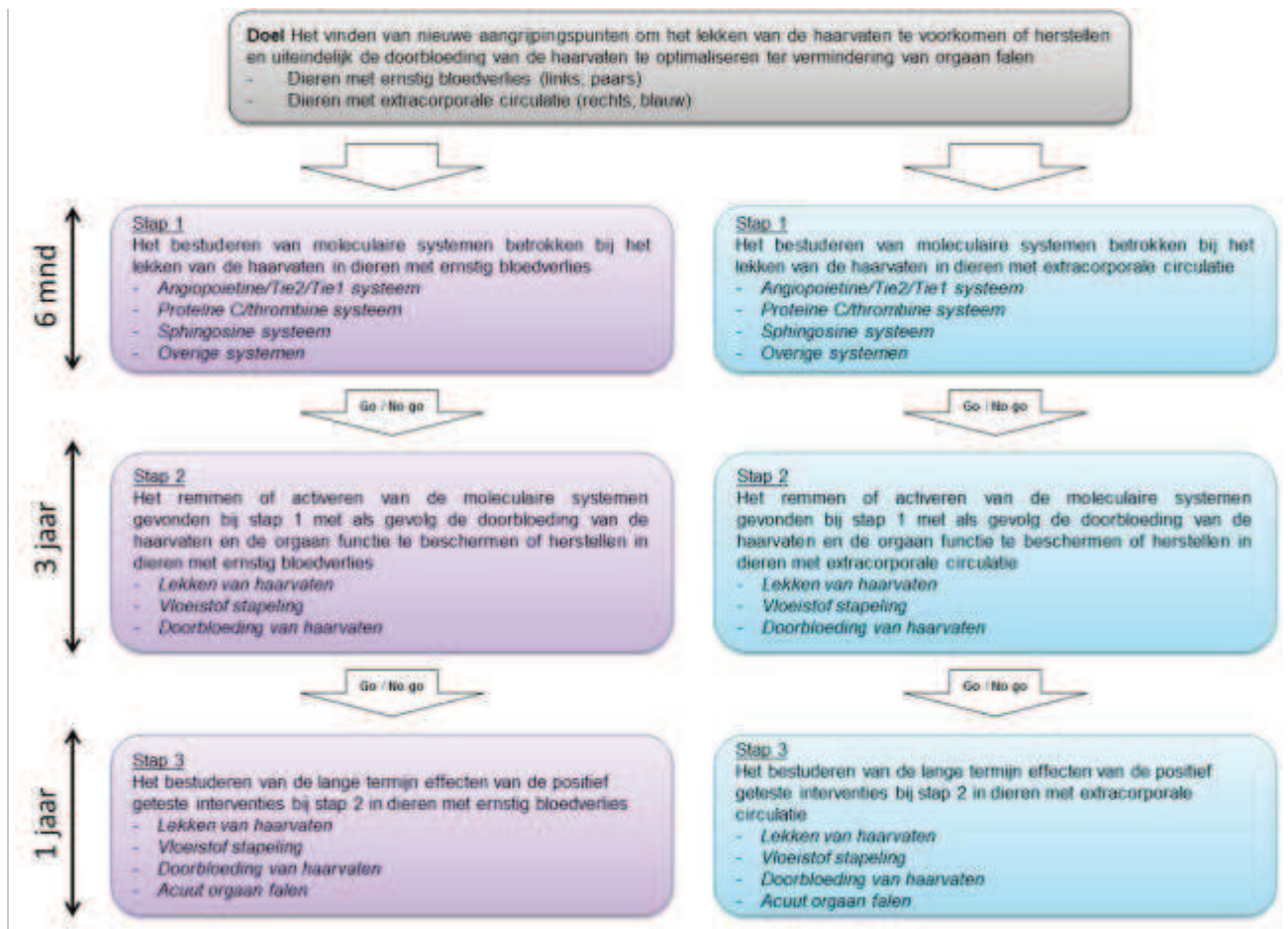
3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Voor het vinden van nieuwe aangrijpingspunten om het lekken van de haarvaten te voorkomen of herstellen en uiteindelijk de doorbloeding van de haarvaten te optimaliseren ter vermindering van orgaan falen zijn drie onderzoeksvragen geformuleerd welke weergegeven zijn in figuur 5. [REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] Wij hebben gekozen om de eerste twee patiëntpopulaties te bestuderen. [REDACTED]

[REDACTED] Figuur 5 is daarom opgesplitst op basis van deze twee patiëntpopulaties; [REDACTED]

[REDACTED] Deze twee diermodellen zullen naast elkaar ingezet worden om de onderzoeksvragen te beantwoorden.



Stap 1: Het bestuderen van moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten

Na 1 uur worden de dieren behandeld met vloeistof volgens de standaard behandeling in de kliniek.

Op twee momenten worden de dieren opgeofferd:

De nieren, de longen en het plasma worden bestudeerd op moleculair niveau (RNA en eiwit). Verschillende moleculaire systemen die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten zullen worden bestudeerd, zoals:

1. [redacted] systeem
2. Proteïne C/thrombine systeem
3. Sphingosine systeem
4. Overige (onbekende) systemen (vascular endothelial growth factor, intergrinen)

Veranderingen in deze moleculaire systemen zijn de basis voor het vinden van nieuwe targets voor medicatie om de doorbloeding van de haarvaten en de orgaanfunctie te verbeteren.

Stap 2: Het remmen of activeren van de moleculaire systemen gevonden bij vraag 1 met als gevolg de doorbloeding van de haarvaten en de orgaan functie te beschermen of herstellen

Nadat de moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten [REDACTED] in kaart zijn gebracht, zullen we interfereren in deze moleculaire systemen. De meest relevante eiwitten of genen zullen we stimuleren of remmen met bestaande interventies. Dit kunnen bv. medicijnen zijn die in een andere context (ander ziektebeeld) worden gebruikt. De effecten van deze interventies worden bestudeerd op het lekken van de haarvaten, het stapelen van vloeistof in de omliggende weefsels en de doorbloeding van de haarvaten. Het aantal te testen interventies schatten wij op 6 in een periode van 3 jaar in verband met de tijd die deze experimenten in beslag zullen nemen en de capaciteit van onze onderzoeksgroep.

Stap 3: Het bestuderen van de lange termijn effecten van de positief geteste interventies bij vraag 2

Het effect van de interventies met de grootste potentie om orgaan falen te verminderen zullen op langere termijn bestudeerd worden. Ernstig zieke patiënten ontwikkelen de meeste complicaties op de Intensive Care (dag 1) en orgaan falen gemiddeld binnen drie dagen [REDACTED]

De periode kenmerkend voor de Intensive Care zal bestaan uit het bestuderen van het effect van de interventie in gesedeerde dieren tot 6 uur [REDACTED]. In de tweede fase worden de dieren bijgebracht uit de sedatie en worden vervolgd voor meerdere dagen [REDACTED]. In deze dieren worden de nieren, de longen en het plasma bestudeerd op markers van acuut nier falen en acuut long falen.

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

Diermodellen

Stoornissen in de doorbloeding van de haarvaten zijn kenmerkend voor ernstig zieke patiënten. Twee diermodellen die representatief zijn voor ernstig zieke patiënten zijn dieren [REDACTED]

[REDACTED] en vervolgens worden de muizen behandeld met vloeistof tot de bloeddruk van de start van de procedure weer is bereikt. De muizen worden nog 1 uur na herstel van de macrocirculatie (bloeddruk, hartslag) vervolgd. Gedurende de eerste 2 fases van het onderzoek zijn de muizen de gehele periode onder narcose en wordt er aanvullend perioperatieve pijnbestrijding gegeven. In de derde fase van het onderzoek worden de muizen bijgebracht uit de narcose zodra de macrocirculatie herstelt is [REDACTED] (ongeveer een uur na start standaard behandeling met vocht) en zullen worden vervolgd voor meerdere dagen.

[REDACTED] is het meest vertaalbaar naar de klinische situatie. Echter heeft een exponentiële toename in het verlies van het aantal muizen en het niet kunnen beïnvloeden van de diepte [REDACTED], waardoor er een grotere variatie in de groepen aanwezig en meer dieren nodig zijn om een effect aan te tonen tot de beslissing geleid [REDACTED]

en worden de ratten nog 1 uur vervolgd onder narcose (of langer zoals beschreven bij onderzoeksvraag 3). Gedurende de eerste 2 fases van het onderzoek zijn de ratten de gehele periode onder narcose en wordt er aanvullend perioperatieve pijnbestrijding gegeven. In de derde fase van het onderzoek worden

de ratten [redacted] bijgebracht uit de narcose zodra de macrocirculatie stabiel is (ongeveer een uur [redacted] en vervolgd voor meerdere dagen.

Er is gekozen om de ratten voor 75 minuten [redacted] omdat dit de gemiddelde periode is dat een patiënt [redacted]

Het [redacted] is helaas niet mogelijk in de muis. Dit heeft te maken met het volume [redacted] en de verdunning die in de dieren plaats vindt. Mogelijkheden voor een kleinere [redacted] zijn helaas nog niet haalbaar. Dit beperkt ons in het bestuderen van de betrokken moleculaire systemen, maar gelukkig zijn er interventies mogelijk zoals het toedienen van siRNA of andere inhibitoren of stimulators.

Moleculaire analyses

De primaire uitkomst bij onderzoeksvraag 1 zijn veranderingen in de moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten. Op 2 tijdstipmomenten zullen de dieren getermineerd worden en wordt weefsel gebruikt om de veranderingen op moleculair niveau in kaart te brengen.

Lekken van de haarvaten

Onze hypothese is dat de doorbloeding van de haarvaten verstoord is doordat de haarvaten lekken. Het lekken van de haarvaten wordt over de tijd bestudeerd. Onder narcose zullen de metingen op 5 momenten uitgevoerd worden om inzicht te krijgen wanneer de vaten gaan lekken en welke factoren hier aan bijdragen.

Vloeistof stapeling

Onze hypothese is dat door het lekken van vloeistof uit de haarvaten in het omliggende weefsel een verhoogde druk ontstaat wat resulteert in het dichtdrukken van de haarvaten en het belemmeren van de doorbloeding van de haarvaten. Het stapelen van vloeistof zal indirect gemeten worden door de drukopbouw in het weefsel te meten. De methode die hiervoor gebruikt wordt meet continue de druk in het weefsel en dit zal ons een indicatie geven hoe de druk opgebouwd wordt en wanneer dit effect heeft op de doorbloeding van de haarvaten.

Doorbloeding van de haarvaten

De doorbloeding van de haarvaten is de primaire uitkomst parameter bij onderzoeksvraag 2 en wordt met verschillende technieken in verschillende organen gemeten. We hebben gekozen om verschillende technieken te gebruiken omdat technieken vaak maar in 1 orgaan toepasbaar zijn. Onder narcose zullen de metingen op verschillende momenten uitgevoerd worden om inzicht te krijgen wanneer de doorbloeding verstoord raakt en welke factoren hier aan bijdragen.

Orgaan falen

Als gevolg van een verstoorde doorbloeding zullen de omliggende weefsels minder of geen zuurstof krijgen (hypoxie) wat uiteindelijk leidt tot het falen van de organen. Markers voor orgaan falen zijn de primaire uitkomst maten bij onderzoeksvraag 3. Deze markers zullen bepaald worden in het bloed, welke op 3 verschillende momenten tijdens het experiment afgenomen zal worden. Daarnaast worden er moleculaire analyses uitgevoerd in de organen van interesse, zoals de nieren en de longen. Dit vereist terminatie van de dieren aan het einde van het experiment.

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.

Onderzoeksvraag 1 is gericht op het bestuderen van de moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten. Voor het uitvoeren van deze experimenten is een periode geschat van 6 maanden op basis van het feit dat beide diermodellen en de technieken voor de moleculaire analyses al lopend binnen onze onderzoeksgroep.

Omdat veranderingen in moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten de basis zijn voor het vinden van nieuwe aangrijpingspunten zal vervolgens het eerste Go / No go moment

plaatsvinden (zie figuur 6). Of we doorgaan naar de tweede onderzoeksvraag zal bekeken worden per moleculair systeem. Met betrekking tot het [REDACTED] systeem en het proteïne C/thrombine systeem hebben wij aangetoond dat modulatie van deze systemen [REDACTED] [REDACTED]) de doorbloeding van de haarvaten kunnen herstellen of beschermen. De verwachting is dan ook zeer groot dat we op basis van de te verwachten bevindingen door kunnen gaan naar onderzoeksvraag 2. De overige moleculaire systemen worden in hetzelfde weefsel onderzocht en hiervoor zullen dus geen extra dieren getermineerd worden.

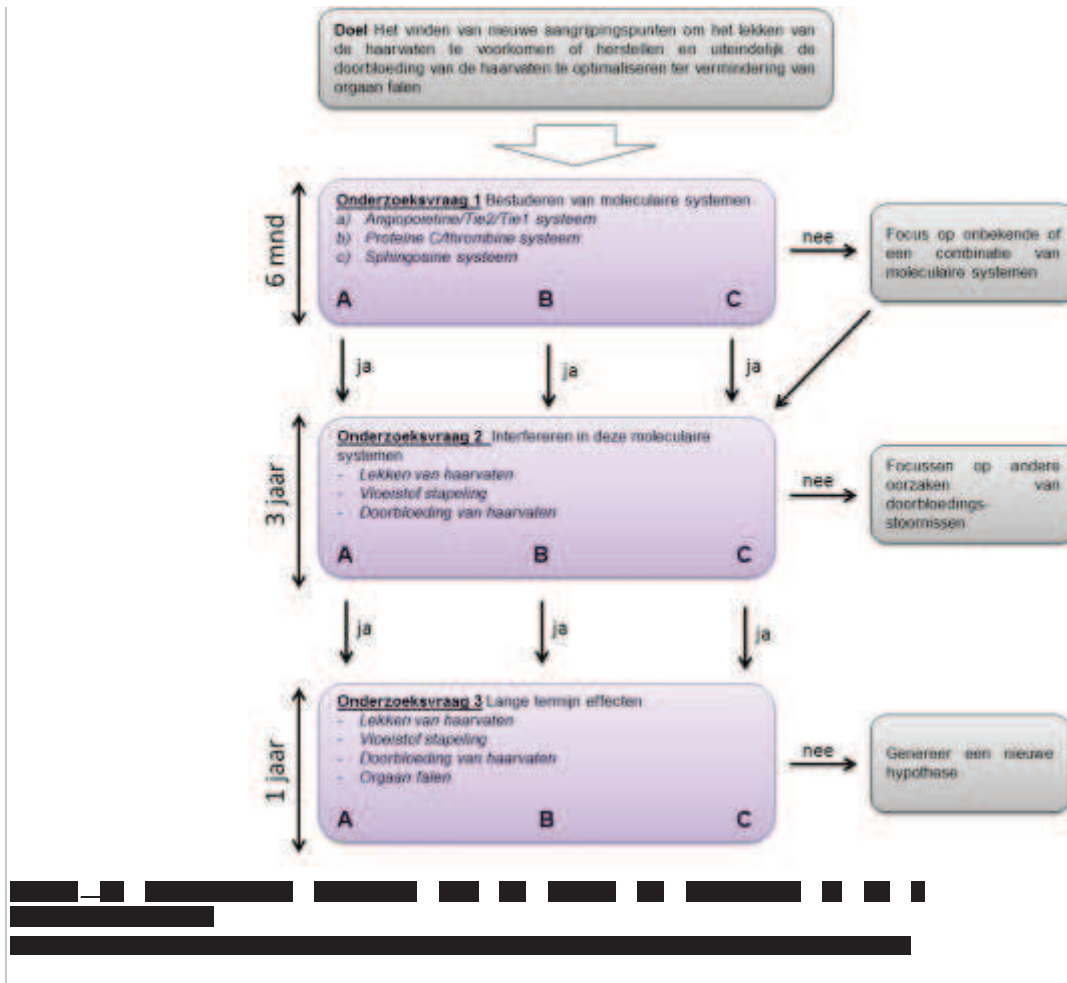
Onderzoeksvraag 2 richt zich op het interfereren in deze moleculaire systemen door bepaalde eiwitten of genen te stimuleren of remmen in dezelfde diermodellen zoals beschreven onder onderzoeksvraag 1. De effecten van deze interventies worden bestudeerd op het lekken van de haarvaten, het stapelen van vloeistof in de omliggende weefsels en de doorbloeding van de haarvaten. Deze periode zal het grootste gedeelte van de tijd in beslag nemen omdat het bijvoorbeeld tijd kost om transgene muizen te importeren of ons model bij een andere onderzoeksgroep uit te voeren.

Het tweede Go / No go moment is gebaseerd op het effect van deze interventies op de doorbloeding van de haarvaten, aangezien dit de belangrijkste bepalende parameter is voor het ontwikkelen van orgaan falen. We gaan door naar onderzoeksvraag 3 op het moment dat de interventie de doorbloeding van de haarvaten beschermt of herstelt. Het Go / No go moment zal per interventie bekeken worden. Van belang is dat onderscheid wordt gemaakt tussen interventies met als doel de doorbloeding van de haarvaten te herstellen (mogelijke medicatie) of interventies met een negatief effect om het belang van bepaalde moleculaire systemen aan te tonen.

Bij onderzoeksvraag 3 zullen we de dieren bij laten komen uit de narcose als we geen negatieve effecten zien van de interventie op het ontwikkelen van orgaan falen.

Een voorbeeld is dat wij hebben laten zien dat stimulatie van het [REDACTED] systeem door toediening van een medicijn met vergelijkbare werking als [REDACTED] het lekken van de haarvaten vermindert en de doorbloeding van de haarvaten herstelt in ernstig zieke dieren. De positieve resultaten van deze [REDACTED] analoog op de doorbloeding van een haarvaten is een Go voor verder onderzoek. Tegelijkertijd willen wij uitzoeken of deze [REDACTED] analoog daadwerkelijk via het [REDACTED] systeem werkt door [REDACTED] te remmen. Het remmen van [REDACTED] heeft een negatief effect en wordt niet gezien als interventie voor een Go /No go beslissing omdat dit geen interventie is met als doel dat het een nieuw medicijn is in deze context.

Aangezien verschillende moleculaire systemen bestudeerd worden is het mogelijk dat de onderzoeksvragen 1 t/m 3 gedeeltelijk zullen overlappen (bv. wij hebben al aangetoond dat het [REDACTED] systeem betrokken is bij een slechtere doorbloeding van de haarvaten en kunnen al met stap 2 doorgaan, terwijl andere moleculaire systemen nog in stap 1 bestudeerd moeten worden). Logischerwijs worden per moleculair systeem en per interventie dezelfde Go / No go criteria aangehouden.



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

Volgnummer	Type dierproef
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|-------------------------------|
| 1 | <input type="text" value=""/> |

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.

Diermodel	1. Ernstig bloedverlies
Moleculaire systemen	1. Angiopoetine/Tie2/Tie1 systeem 2. Proteïne C/thrombine systeem 3. Sphingosine systeem 4. Overige systemen
Lekken van haarvaten	1. Extravasatie van blauwe kleurstof 2. Twee-foton microscopie nier
Vloeistof stapeling	1. Millar catheter
Doorbloeding haarvaten	1. Intravitaal microscopie cremaster 2. Contrast echografie nier en hart 3. Twee-foton microscopie nier
Orgaan falen	1. Hyperspectraal imaging 2. Markers in bloed 3. Histologie 4. RNA/eiwit analyses

Diermodel

Stoornissen in de doorbloeding van de haarvaten zijn kenmerkend voor patiënten ██████████

██████████ Het effect van ██████████ wordt bestudeerd in de muis. ██████████

en vervolgens worden de muizen behandeld met vloeistof tot de bloeddruk van de start van de procedure weer is bereikt. Gedurende de eerste 2 fases van het onderzoek worden de muizen nog 1 uur na herstel van de macrocirculatie (bloeddruk, hartslag) vervolgd. Wanneer dit succesvol blijkt te zijn zullen de muizen tijdens onderzoeksvraag 3 na het herstellen van de macrocirculatie voor 6 uur onder narcose vervolgd worden. De muizen zijn de gehele periode onder narcose en er wordt aanvullende perioperatieve pijnbestrijding gegeven. Het ongerief is daarom ingeschat op licht.

Mocht de behandeling tijdens deze experimenten positief blijken zullen wij in de laatste fase van onderzoeksvraag 3 de muizen na het herstellen van de macrocirculatie bij laten komen uit de narcose om de dieren vervolgens nog 7 dagen te vervolgen. Aangezien deze experimenten matig ongerief met zich meebrengen zullen de muizen postoperatieve pijnbestrijding ontvangen en zijn er duidelijke humane eindpunten vastgesteld.

Er zijn twee methoden beschreven om ██████████ Tijdens

██████████ is het meest vertaalbaar naar de klinische situatie. Echter door een exponentiële toename in het verlies van het aantal muizen en het niet kunnen beïnvloeden van de ██████████, waardoor er een grotere variatie in de groepen aanwezig en meer dieren nodig zijn om een effect aan te tonen, hebben wij besloten om shock ██████████

Lekken van de haarvaten

Onze hypothese is dat de doorbloeding van de haarvaten verstoord is doordat de haarvaten lekken. Het lekken van haarvaten kan op meerdere manieren bestudeerd worden.

1. Evans blue extravasatie

Aan het einde van de experimenten, terwijl de muizen nog onder narcose zijn, wordt een blauwe kleurstof (Evans blue) in de circulatie gespoten via een arteriële lijn. Na opofferen wordt de mate van blauw kleuring in de organen bepaald met een spectrofotometer. Het is een simpele techniek waarbij de muizen opgeofferd moeten worden om de mate van blauwkleuring te meten.

2. Twee-foton microscopie

Twee-foton microscopie is een invasieve methode maar heeft als voordeel dat het lekken van de haarvaten over de tijd bestudeerd kan worden. Bij deze techniek wordt onder narcose en pijnstilling een window (een soort raampje) geplaatst in de huid ten hoogte van de nier. Het lekken van de haarvaten wordt in beeld gebracht door het toedienen van fluorescente markers via een veneuze lijn. Een voordeel van deze techniek is dat ook de doorbloeding van de haarvaten over de tijd gemeten kan worden wat uiteindelijk leidt tot vermindering van het aantal muizen.

Vloeistof stapeling

Onze hypothese is dat door het lekken van vloeistof uit de haarvaten in het omliggende weefsel een verhoogde druk ontstaat wat resulteert in het dichtdrukken van de haarvaten en het belemmeren van de doorbloeding van de haarvaten.

1. Interstitiële drukmetingen

Een Millar catheter zal onder narcose en pijnstilling geplaatst worden in de omliggende weefsels, zoals de nieren, om de opbouw in druk over de tijd te meten.

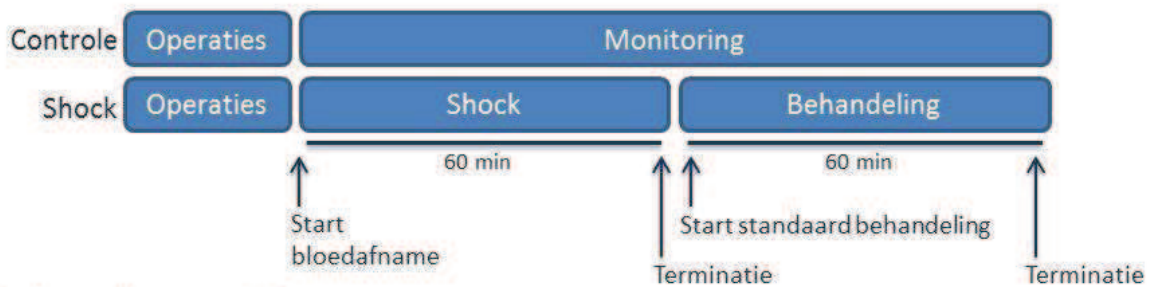
Doorbloeding van de haarvaten

De doorbloeding van de haarvaten wordt met verschillende technieken in verschillende organen gemeten.

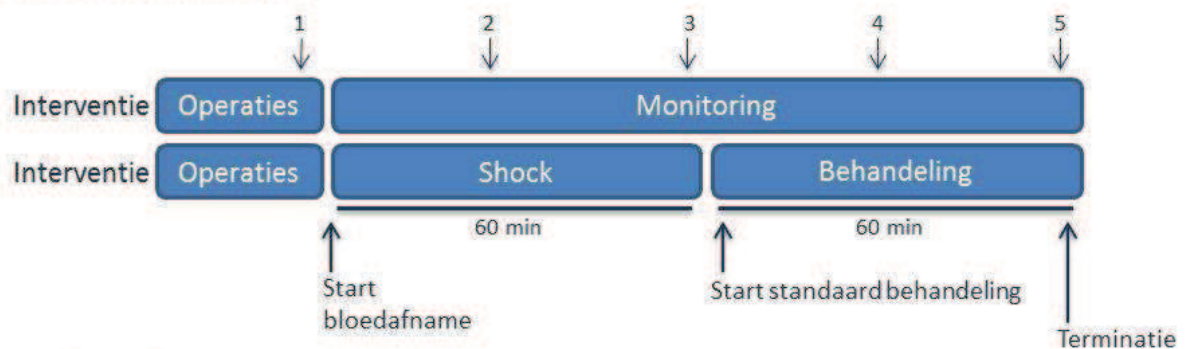
1. Intravitaal microscopie ██████████

De doorbloeding van de haarvaten ██████████ spier wordt bestudeerd met behulp van intravitaal microscopie. De ██████████ wordt onder narcose vrijgeprepareerd aan het begin van een experiment.

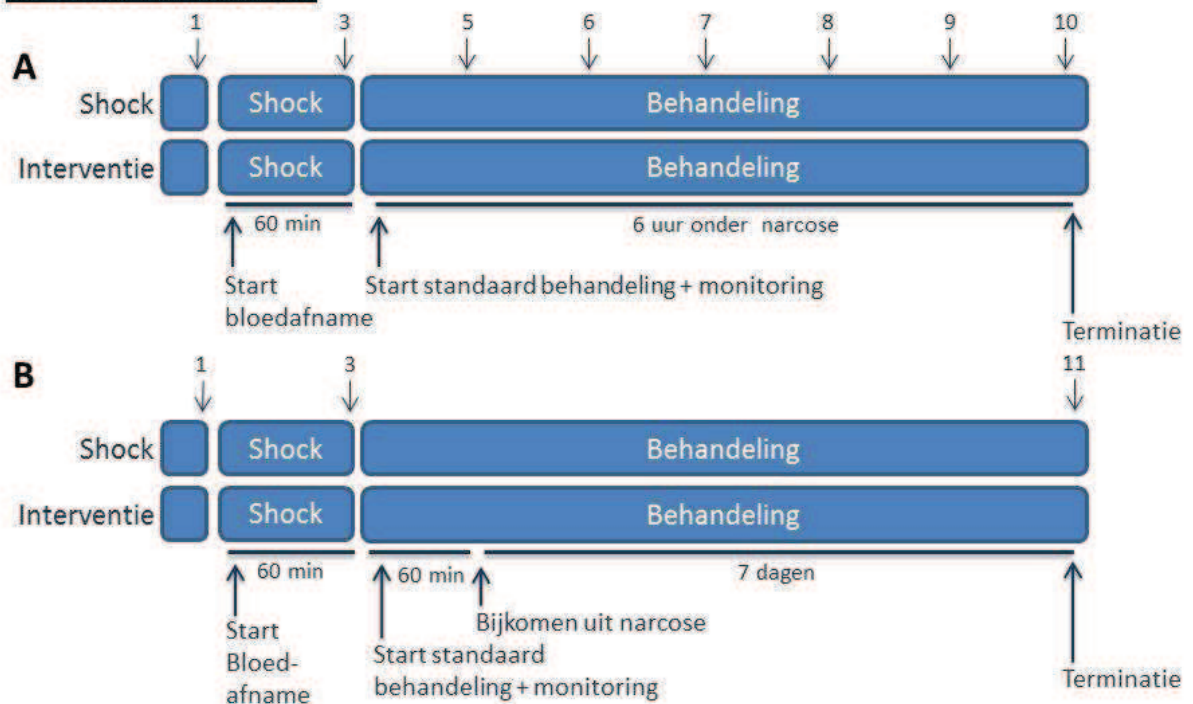
Onderzoeksvraag 1



Onderzoeksvraag 2



Onderzoeksvraag 3



Terminatie:

Bij onderzoeksvraag 1 worden de muizen op 2 momenten getermineerd: 1 uur na [redacted] en 1 uur na de standaard behandeling. Bij onderzoeksvraag 2 en 3 worden de muizen alleen aan het einde van het experiment getermineerd.

Metingen:

De metingen worden verricht op de momenten 1 t/m 11 zoals vermeld in figuur 2. Tijdsmomenten 1 t/m 5: metingen elk half uur en tijdsmomenten 5 t/m 10: metingen elk uur (onderzoeksvraag 3A). Bij onderzoeksvraag 3B zal alleen een meting verricht worden op tijdstippen 1, 3 en 11 (na 7 dagen) in verband met het onder narcose brengen van de muizen. Het gaat hierbij om alle metingen met betrekking tot het lekken van de haarvaten, het stapelen van vloeistof en de doorbloeding van de haarvaten, behalve de uittreding van de blauwe kleurstof omdat dit terminale experimenten betreffen.

Op dezelfde tijdsmomenten zal ook bloed worden afgenomen om circulerende markers te analyseren.

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

De eindpunten van bovenbeschreven onderzoeksvragen zijn:

- 1: moleculaire veranderingen betrokken bij het lekken van de haarvaten
- 2: doorbloeding van de haarvaten
- 3: markers voor orgaan falen

De data verkregen uit de genoemde experimenten zijn numeriek van karakter en zullen worden geanalyseerd met behulp van een student's t-test, one-way of two-way ANOVA met repeated measurements en Bonferroni als post-hoc analyse. De keuze van de statistische analyse hangt af van de te testen parameter en studie opzet.

Onderzoeksvraag 1

De poweranalyse is gebaseerd op een eerder uitgevoerde studie in ratten ██████████, waarbij een verlaging van ██████ gen expressie in de nier is gevonden: controle $0,083 \pm 0,030$ a.u. vs. ██████ $0,043 \pm 0,018$ a.u.

$$(n/2)^{1/2} = z_{\alpha/2} - z_{\beta} / ((\mu_1 - \mu_2) / \sigma)$$

Waarbij

$$z_{\alpha/2} - z_{\beta} = 3,242 \quad (\alpha = 0,05, \beta = 0,90)$$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (0,083 - 0,043) = 0,04$$

$$\text{variantie } \sigma = 0,024$$

$$(n/2)^{1/2} = 1,945 \rightarrow n = 8$$

Met een alfa van 0.05 en beta van 0.9 komen wij dan uit op 8 muizen per groep. Met een uitval van 10% door ██████████ en 10% uitval bij de moleculaire analyses gebaseerd op de ervaringen in ratten zijn 9 muizen per groep noodzakelijk.

Onderzoeksvraag 2

De poweranalyse is gebaseerd op een eerder uitgevoerde studie in ratten ██████████. De poweranalyse is gebaseerd op de uitkomsten van meerdere technieken omdat deze technieken niet in 1 dier uit te voeren zijn.

Intravitaal microscopie

Verhoging van het aantal doorbloede haarvaten in ██████████ van ratten ██████████ met een behandeling gericht op het stimuleren van ██████████ $6,53 \pm 3,59$ vs. ██████████ met behandeling $9,60 \pm 2,59$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (9,60 - 6,53) = 3,07$$

$$\text{variantie } \sigma = 3,09$$

$$(n/2)^{1/2} = 3,26 \rightarrow n = 21$$

Met een alfa van 0.05 en beta van 0.9 komen wij dan uit op 21 muizen per groep. Met een uitval van 10% door te ██████████ gebaseerd op de ervaringen in ratten zijn 23 muizen per groep noodzakelijk.

→ De moleculaire analyses worden ook in deze groepen muizen uitgevoerd, zodat hiervoor geen extra muizen nodig zijn.

Extravasatie van blauwe kleurstof

Afname van extravasatie van de blauwe kleurstof in de longen in ratten ██████████ met een behandeling gericht op het stimuleren van ██████████ $16,08 \pm 6,97$ vs. ██████████ met behandeling $10,07 \pm 3,30$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (16,08 - 10,07) = 6,01$$

$$\text{variantie } \sigma = 5,14$$
$$(n/2)^{1/2} = 2,77 \rightarrow n=16$$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 16 muizen per groep. Met een uitval van 10% door te [REDACTED] gebaseerd op de ervaringen in ratten zijn 18 muizen per groep noodzakelijk.

Contrast echografie

De poweranalyse is gebaseerd op artikel van een andere onderzoeksgroep. [REDACTED] Zij vonden een afname in TTP (maat voor de doorbloeding van de nieren) in ratten [REDACTED] controle $7,5 \pm 5,0$ s vs [REDACTED] $18,5 \pm 8,8$ s.

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (18,5 - 7,5) = 11$$

$$\text{variantie } \sigma = 6,9$$

$$(n/2)^{1/2} = 2,03 \rightarrow n=9$$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 9 muizen per groep. Met een uitval van 10% door te [REDACTED] en 10% uitval bij analyses gebaseerd op de ervaringen in ratten zijn 10 muizen per groep noodzakelijk.

Twee-foton microscopie

Er zijn nog geen analyses gedaan met betrekking tot het lekken van de haarvaten in de nier [REDACTED] [REDACTED] Daarom is de poweranalyse gebaseerd op een artikel van een andere onderzoeksgroep (Sharfudding A, J Am Soc Nephrol 2009; 20: 524-534). Zij vonden een afname van het lekken van de haarvaten in ischemische nieren na behandeling in vergelijking met onbehandelde ischemische nieren: controle $5,25 \pm 4,50$ vs [REDACTED] $0,50 \pm 0,62$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (5,25 - 0,50) = 4,75$$

$$\text{variantie } \sigma = 2,56$$

$$(n/2)^{1/2} = 1,75 \rightarrow n = 7$$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 7 muizen per groep. Met een uitval van 10% door te [REDACTED] gebaseerd op de ervaringen in ratten en een uitval van 10% op basis van de analyses zijn 8 muizen per groep noodzakelijk.

Onderzoeksvraag 3

A: zie onderzoeksvraag 2

B: De poweranalyse is gebaseerd op artikel van een andere onderzoeksgroep. [REDACTED] Zij vonden een toename in het circulerend creatinine (markers voor nierschade) in ratten [REDACTED] [REDACTED]: controle 27 ± 4 vs [REDACTED] 42 ± 14 $\mu\text{mol/L}$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (42 - 27) = 14$$

$$\text{variantie } \sigma = 9$$

$$(n/2)^{1/2} = 2,08 \rightarrow n=9$$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 9 muizen per groep. Met een uitval van 20% door te [REDACTED] en de overleving na het bij komen uit de narcose en een uitval van 10% bij de moleculaire analyses gebaseerd op de ervaringen in ratten zijn 12 muizen per groep noodzakelijk.

B. De dieren

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

Gekozen is om de onderzoeksvragen te beantwoorden in jong volwassen, mannelijke C57Bl6 muizen afkomstig van een erkende leverancier. De transgene muizen zullen afkomstig zijn van een erkende leverancier of eigen fok. Er wordt geen ongerief verwacht bij de fokdieren. Er zullen maximaal 1878 muizen gebruikt worden (zie tabel 1).

Er is gekozen voor muizen van het mannelijke geslacht, omdat het meten van de doorbloeding in de haarvaten wordt gedaan met behulp van intravitaal microscopie [REDACTED]

Een voordeel van muizen ten opzichte van ratten is dat de stap om bepaalde moleculaire systemen te moduleren makkelijker is in muizen. Tijdens dit onderzoek zullen wij genetische modellen benutten tijdens

stap 2 voor het bestuderen van de rol van bepaalde eiwitten/genen in het ontstaan van doorbloedingsstoornissen en orgaan falen [REDACTED].

Tabel 1: Overzicht van de benodigde muizen

	Techniek	Doel	Aantal groepen ¹	Muizen per groep ²	Aantal interventies ³	Terminatie momenten ⁴	Totaal aantal muizen ⁵
1	Moleculaire analyses + intravitaal microscopie	Moleculaire veranderingen	2	9	0	2	36
2	Intravitaal microscopie + moleculaire analyses	Doorbloeding & moleculaire veranderingen	2	23	6	2	552
	Extravasatie EB	Vaatlekkage	4 (incl controle groepen vraag 1)	18	6	1	432
	Contrast echo	Doorbloeding	4 (incl controle groepen vraag 1)	10	6	1	240
	Twee-foton microscopie	Doorbloeding & vaatlekkage	4 (incl controle groepen vraag 1)	8	6	1	192
3A	Intravitaal microscopie + moleculaire analyses	Doorbloeding & moleculaire veranderingen	2	23	3	1	138
	Extravasatie EB	Vaatlekkage	2	18	3	1	108
	Contrast echo	Doorbloeding	2	10	3	1	60
	Twee-foton microscopie	Doorbloeding & vaatlekkage	2	8	3	1	48
3B	Moleculaire analyses	Schade markers & moleculaire veranderingen	2	12	3	1	72
						Totaal:	1878

¹ Aantal groepen op basis van figuur 2

² Muizen per groep gebaseerd op de poweranalyse

³ Modulaties van moleculaire systemen. Het aantal interventies is geschat op 6 en 3 op basis van ervaring, literatuur, tijd en capaciteit van de onderzoeksgroep.

⁴ Momenten waarop muizen getermineerd worden: [REDACTED] (figuur 2)

⁵ Totaal aantal muizen: 1*2*3*4

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 bestuderen van het lekken en de doorbloeding van de haarvaten [REDACTED] in mensen is zeer complex. Vanaf de binnenkomst van een dergelijke patiënt in het ziekenhuis vinden er acute

interventies en transportmomenten plaats die maken dat de metingen praktisch onuitvoerbaar zijn. Daarnaast zal in de kliniek onmiddellijk worden overgegaan op het geven van [REDACTED] [REDACTED] en er geen gecontroleerde situatie ontstaat waarin wij kunnen meten. Tot slot is de toediening van de meeste interventies in patiënten nog zeer experimenteel, en zijn meer dierstudies nodig om de effecten op de doorbloeding van deze middelen te kunnen bestuderen. Daarom zijn dierproeven essentieel voor dit onderzoek en kunnen niet worden vervangen. Vervanging van de dierproeven door middel van celkweken is naar onze mening niet mogelijk, omdat er geen celkweek modellen bestaan die de complexe interactie van de bloedstroom, de binnenbekleding van de haarvaten en orgaanschade nabootsen. Om die reden is er naar ons weten geen alternatief voor de hier voorgestelde dierproeven.

Vermindering

Binnen de studie hebben wij voor technieken gekozen die in één dier op verschillende tijdstippen kunnen meten. Hierdoor kunnen wij de effecten [REDACTED] bepalen en vervolgens de effecten van de standaard klinische behandeling, zodat er geen extra groep muizen nodig is. Daarnaast is het mogelijk om verschillende technieken in één dier te combineren, wat leidt tot vermindering van het aantal muizen. Door bijvoorbeeld na terminatie de organen uit de muizen die gebruikt worden voor intravitaal microscopie te isoleren, is het niet nodig hier extra dieren voor te includeren. Ten slotte zijn het aantal muizen per groep door een poweranalyse tot een minimum beperkt.

Verfijning

Wij hebben getracht het ongerief zo laag mogelijk te houden door alle handelingen onder adequate narcose en pijnstilling te laten plaatsvinden, en de experimenten dusdanig te ontwerpen dat het dier tijdens de narcose wordt getermineerd (1, 2 en 3A). Bij de laatste stap (onderzoeksvraag 3B) zullen wij de muizen bij laten komen uit de narcose, maar deze muizen zullen adequate pijnstilling krijgen om het ongerief zo gering mogelijk te houden. De laatste stap voeren wij uit om de vergelijking met de humane situatie zo groot mogelijk te maken aangezien patiënten [REDACTED] pas na enkele dagen orgaanschade zullen ontwikkelen.

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

Alle handelingen vinden plaats onder adequate narcose en pijnstilling. Bij onderzoeksvragen 1, 2 en 3A zullen de muizen niet bijkomen uit de narcose. Bij onderzoeksvraag 3B zullen de muizen wel bijkomen uit de narcose, maar zal adequate pijnstilling worden toegediend in de postoperatieve periode om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden.

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.

Voorheen hebben wij laten zien dat [REDACTED] in ratten leidt tot verstoringen in de doorbloeding van de haarvaten [REDACTED] en dat het [REDACTED] systeem hierbij betrokken is. Deze resultaten vormen de basis van deze vervolg aanvraag. Wij hebben financiering ontvangen om onze eerder bevonden resultaten te bestuderen in verschillende klinisch relevante organen en de lange termijn effecten van het moduleren van het [REDACTED] systeem. Dit onderzoek is nog niet eerder uitgevoerd in deze en andere patienten populaties.

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?

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

nvt

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

Alle handelingen vinden plaats onder adequate narcose en perioperatieve pijnstilling. Voor de operaties wordt er plaatselijk verdoving gegeven. Zodra er een arterie lijn aanwezig is wordt er aanvullend elke 20 minuten pijnstilling toegediend. Vervolgens worden de muizen de gehele procedure gemonitord. Op basis van veranderingen in hartslag en bloeddruk worden zowel de narcose als pijnstilling aangepast. Ruime expertise is aanwezig om de veranderingen in hartslag en bloeddruk adequaat te interpreteren. De muizen uit onderzoeksvragen 1, 2 en 3A worden onder narcose en pijnstilling getermineerd. Op het moment dat de muizen bijkomen uit de narcose (onderzoeksvraag 3B) wordt in de postoperatieve periode adequate pijnstilling toegediend om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Alle handelingen vinden plaats onder algehele narcose en met adequate pijnbestrijding. Eén procent van de muizen kunnen ongerief ondervinden door het ontwikkelen van acuut nier- of long falen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Vier procent van de muizen zullen bijkomen uit de algehele narcose, hiervan zal minder dan 1/3 schade aan de longen of nieren ontwikkelen ten gevolge van ██████████.

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

Humane eindpunten zullen worden gehanteerd.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Alleen bij onderzoeksvraag 3B zullen wij humane eindpunten hanteren omdat de muizen zullen bijkomen uit de narcose. Ondanks dat de muizen behandeld worden volgens de standaard klinische procedure en adequate pijnstilling in de postoperatieve periode zullen krijgen is het mogelijk dat de muizen een ongunstige prognose hebben. Wij hanteren als humane eindpunten de volgende criteria: een gewichtsverlies van 15%, verminderde activiteit, gebogen rug en een onverzorgde vacht.

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

Wij verwachten dat de kans zeer klein is (<5%). Eerder onderzoek van een onderzoeksgroep waar wij nauw mee samenwerken hebben een 100% overleving laten zien van muizen die bijkwamen uit de narcose ■■■■■■■■■■

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.

Voor onderzoeksvragen 1, 2 en 3A wordt het ongerief geschat op terminaal (zie tabel 2). Het betreft een experiment dat gevolgd wordt door terminatie waarbij alle handelingen plaats vinden onder narcose en adequate pijnstilling. Het ongerief voor de muizen bestaat uit het éénmalige ondergrondse transport van het proefdiercentrum naar het onderzoeksgebouw en het onder narcose brengen van de muizen.

Voor onderzoeksvraag 3B wordt het ongerief geschat op matig (zie tabel 2). Deze muizen zullen niet getransporteerd worden naar een andere faculteit. De muizen worden onder narcose gebracht en alle handelingen zullen plaatsvinden onder algehele narcose en adequate pijnstilling. Vervolgens zullen de muizen bijkomen uit de narcose en worden voor 7 dagen vervolgt onder postoperatieve pijnstilling waar nodig. Voor terminatie worden de muizen nogmaals onder narcose gebracht.

Tabel 2: Ongerief classificatie

(% = percentage muizen die handeling ondergaan / n = aantal muizen die handeling ondergaan

Soort ongerief	Stap 1		Stap 2		Stap 3A		Stap 3B	
	%	n	%	n	%	n	%	n
Transport van huisvesting naar lab	100	36	100	1416	100	354		
Inductie narcose	100	36	100	1416	100	354	100	72
Bijkomen narcose							100	72
Pijnstilling i.p.							100	72
Opnieuw narcose voor terminatie							100	72
Cumulatief ongerief	Terminaal		Terminaal		Terminaal		Matig	

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De organen en het bloed worden gebruikt voor moleculaire analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

x Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|----------------|
| 2 | [Redacted] |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Diermodel	1. Extracorporale circulatie
Moleculaire systemen	1. Angiopoetine/Tie2/Tie1 systeem 2. Proteïne C/thrombine systeem 3. Sphingosine systeem 4. Overige systemen
Lekken van haarvaten	1. Extravasatie van blauwe kleurstof 2. Twee-foton microscopie nier
Vloeistof stapeling	1. Millar catheter
Doorbloeding haarvaten	1. Intravitaal microscopie cremaster 2. Contrast echografie nier en hart 3. Twee-foton microscopie nier
Orgaan falen	1. Hyperspectraal imaging 2. Markers in bloed 3. Histologie 4. RNA/eiwit analyses

Diermodel

[REDACTED]. Er is gekozen om de ratten voor 75 minuten [REDACTED] omdat dit de gemiddelde periode is dat een patiënt [REDACTED]. Na 75 minuten wordt [REDACTED] en worden de ratten bij onderzoeksvragen 1 en 2 nog 1 uur vervolgd onder narcose. Wanneer dit succesvol is zullen de ratten bij fase 1 van onderzoeksvraag 3 [REDACTED] voor 6 uur onder narcose vervolgd worden. De ratten zijn gedurende deze experimenten continue onder narcose en er wordt aanvullende perioperatieve pijnbestrijding toegediend. Bij deze experimenten verwachten wij dat er licht ongerief zal zijn. Wanneer de behandeling van deze dieren een positief effect laat zien zullen we de dieren [REDACTED] bij laten komen uit de narcose en voor 7 dagen vervolgen. Aangezien deze experimenten matig ongerief met zich meebrengen zullen de ratten postoperatieve pijnbestrijding toegediend krijgen en zijn er duidelijke humane eindpunten vastgesteld. Het [REDACTED] is helaas niet mogelijk in de muis. Dit heeft te maken met het [REDACTED] die in de dieren plaats vindt. Mogelijkheden voor een [REDACTED] zijn helaas nog niet haalbaar.

Lekken van de haarvaten

Onze hypothese is dat de doorbloeding van de haarvaten verstoord is doordat de haarvaten lekken. Het lekken van haarvaten kan op meerdere manieren bestudeerd worden.

1. *Evans blue extravasatie*

Aan het einde van de experimenten, terwijl de ratten nog onder narcose zijn, wordt een blauwe kleurstof (Evans blue) in de circulatie gespoten via een arteriële lijn. Na opofferen wordt de mate van blauw kleuring in de organen bepaald met een spectrofotometer. Het is een simpele techniek waarbij de ratten opgeofferd moeten worden om de mate van blauwkleuring te meten.

2. *Twee-foton microscopie*

Twee-foton microscopie is een invasieve methode maar heeft als voordeel dat het lekken van de haarvaten over de tijd bestudeerd kan worden. Bij deze techniek wordt onder narcose en pijnstilling een window (een soort raampje) geplaatst in de huid ten hoogte van de nier. Het lekken van de haarvaten wordt in beeld gebracht door het toedienen van fluorescente markers via een veneuze lijn. Een voordeel van deze techniek is dat ook de doorbloeding van de haarvaten over de tijd gemeten kan worden wat uiteindelijk leidt tot vermindering van het aantal ratten.

Vloeistof stapeling

Onze hypothese is dat door het lekken van vloeistof uit de haarvaten in het omliggende weefsel een verhoogde druk ontstaat wat resulteert in het dichtdrukken van de haarvaten en het belemmeren van de doorbloeding van de haarvaten.

1. *Interstitiële drukmetingen*

Een Millar catheter zal onder narcose en pijnstilling geplaatst worden in de omliggende weefsels, zoals de nieren, om de opbouw in druk over de tijd te meten.

Doorbloeding van de haarvaten

De doorbloeding van de haarvaten wordt met verschillende technieken in verschillende organen gemeten.

1. *Intravitaal microscopie* [REDACTED]

De doorbloeding van de haarvaten [REDACTED] wordt bestudeerd met behulp van intravitaal microscopie. De [REDACTED] wordt onder narcose vrijgeprepareerd aan het begin van een experiment.

[REDACTED]. Het meten van de doorbloeding [REDACTED] kan goed gecombineerd worden met het verzamelen van weefsels voor RNA en eiwit analyses omdat er bv. geen contrast middel nodig is.

2. *Contrast echografie*

Een methode om de doorbloeding in meer vitale organen te meten zoals de nieren en het hart is contrast echografie. Met behulp van met gas gevulde bubbels en ultrageluid kunnen in ratten onder narcose verschillen in de doorbloeding tussen organen en over de tijd bestudeerd worden. Daarnaast wordt deze

techniek ook gebruikt in patiënten wat de translatie van het meten van de doorbloeding van de haarvaten met deze specifieke techniek naar de patiënten vergroot.

3. *Twee-foton microscopie*

De doorbloeding van de haarvaten in de nier wordt bestudeerd met twee-foton microscopie door het toedienen van fluorescente markers (zie ook 'lekkers van de haarvaten'). Een voordeel van deze techniek is dat onderscheidt gemaakt kan worden in de grootte van de vaten en tegelijkertijd het lekken van de haarvaten in beeld gebracht kan worden. Daarbij kan gebruik gemaakt worden van verschillende molecuulgroottes van de fluorescente markers om meer inzicht te krijgen in de mate van lekkage.

Orgaan falen

Als gevolg van een verstoorde doorbloeding zullen de omliggende weefsels minder of geen zuurstof krijgen (hypoxie) wat uiteindelijk leidt tot het falen van de organen.

1. *Hyperspectraal imaging*

De hyperspectraal camera maakt het mogelijk om oxyhemoglobine en deoxyhemoglobine te meten en de hoeveelheid zuurstof in de weefsels te bepalen in ratten onder narcose. Het voordeel van deze techniek is dat deze ook in de klinische setting gebruikt kan worden.

2. *Markers in bloed*

Tijdens de experimenten wordt er op meerdere tijdstippen bloed afgenomen om eiwitten die een rol spelen bij het falen van de organen te bestuderen in het plasma (bv. met behulp van ELISA's).

3. *Histologie*

Aan het einde van de experimenten worden verschillende organen ingevroren voor verdere moleculaire analyses. Door middel van (immuno)histologie wordt gekeken naar schade in de organen.

4. *RNA/eiwit analyses*

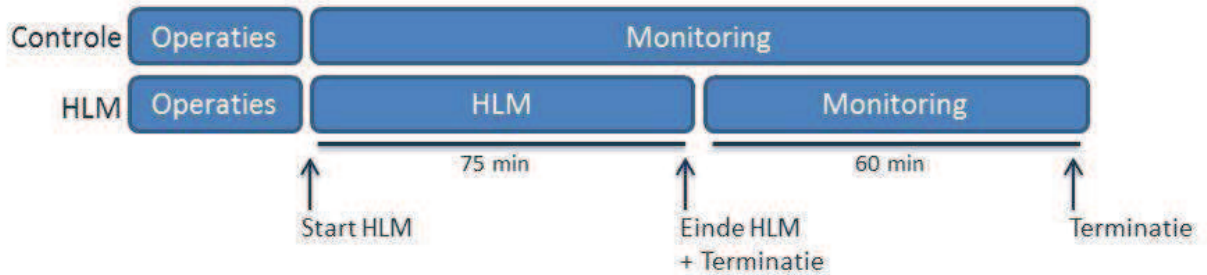
Eiwit en gen expressie profielen worden gemeten met behulp van western blotten en PCR, respectievelijk.

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

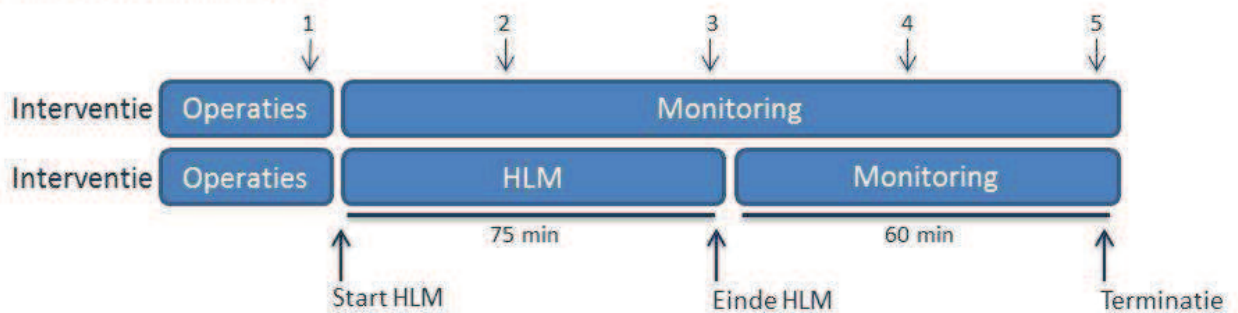
Een schematisch overzicht van de experimenten is weergegeven in figuur 2. De experimenten bestaan uit 2 groepen; een controle groep en een groep waarbij de ratten

De HLM groep bestaat uit ratten die voor 75 minuten. Na worden de ratten nog 1 uur vervolgd onder narcose bij onderzoeksvraag 1 en 2, voor 6 uur onder narcose bij onderzoeksvraag 3A of voor 7 dagen na bijkomen uit de narcose bij onderzoeksvraag 3B (zie figuur 2).

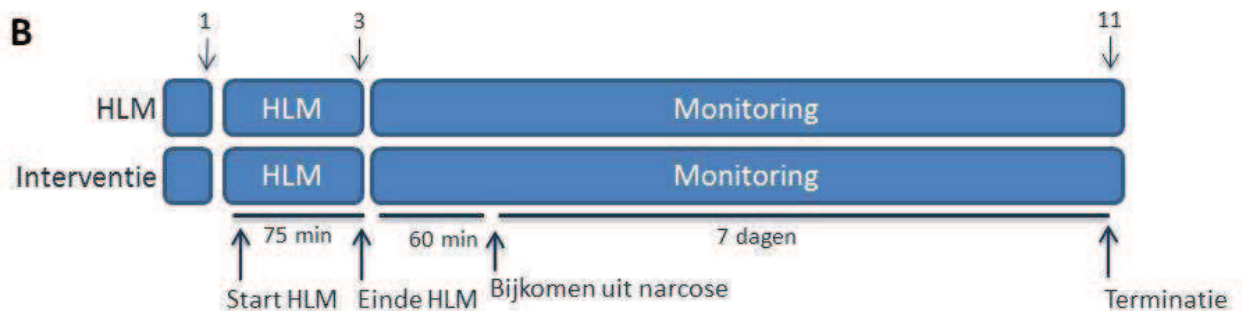
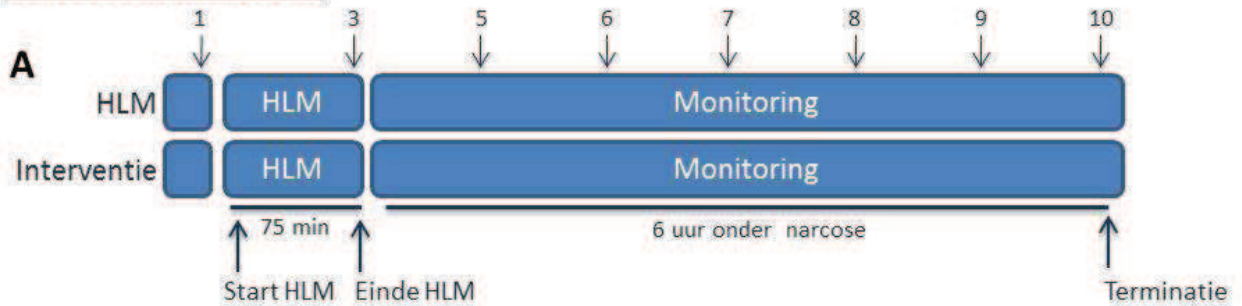
Onderzoeksvraag 1



Onderzoeksvraag 2



Onderzoeksvraag 3



Terminatie:

Bij onderzoeksvraag 1 worden de ratten op 2 momenten getermineerd: Direct [redacted] en 1 uur [redacted]. Bij onderzoeksvraag 2 en 3 worden de ratten aan het einde van het experiment getermineerd.

Metingen:

De metingen worden verricht op de momenten 1 t/m 11 zoals vermeld in figuur 2. Tijdstmomenten 1 t/m 5: metingen elk half uur en tijdstmomenten 5 t/m 10: metingen elk uur (onderzoeksvraag 3A). Bij onderzoeksvraag 3B zal alleen een meting verricht worden op tijdstpunten 1, 3 en 11 (na 7 dagen) in verband met het onder narcose brengen van de ratten. Het gaat hierbij om alle metingen met betrekking tot het lekken van de haarvaten, het stapelen van vloeistof en de doorbloeding van de haarvaten, behalve de extravasatie van de blauw kleurstof omdat dit terminale experimenten betreffen.

Op dezelfde tijdstmomenten zal ook bloed worden afgenomen om circulerende markers te analyseren.

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

De eindpunten van bovenbeschreven onderzoeksvragen zijn:

- 1: moleculaire veranderingen betrokken bij het lekken van de haarvaten
- 2: doorbloeding van de haarvaten
- 3: markers voor orgaan falen

De data verkregen uit de genoemde experimenten zijn numeriek van karakter en zullen worden geanalyseerd met behulp van een student's t-test, one-way of two-way ANOVA met repeated measurements en Bonferroni als post-hoc analyse. De keuze van de statistische analyse hangt af van de te testen parameter en studie opzet.

Onderzoeksvraag 1

De poweranalyse is gebaseerd op een eerder uitgevoerde studie in ratten [REDACTED], waarbij een verlaging van [REDACTED] gen expressie in de nier is gevonden:

Nier: controle $0,00085 \pm 0,00060$ a.u. vs. [REDACTED] $0,00013 \pm 0,00007$ a.u.

$$(n/2)^{1/2} = z_{\alpha/2} - z_{\beta} / ((\mu_1 - \mu_2) / \sigma)$$

Waarbij

$$z_{\alpha/2} - z_{\beta} = 3,242 \quad (\alpha = 0,05, \beta = 0,90)$$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (0,00085 - 0,00013) = 0,00072$$

$$\text{variantie } \sigma = 0,000335$$

$$(n/2)^{1/2} = 1,51 \rightarrow 5$$

Met een alfa van 0.05 en beta van 0.9 komen wij dan uit op 5 ratten per groep. Met een uitval van 30% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] zijn 7 ratten per groep noodzakelijk.

Onderzoeksvraag 2

De poweranalyse is gebaseerd op een eerder uitgevoerde studie in ratten [REDACTED]. De poweranalyse is gebaseerd op de uitkomsten van 4 verschillende technieken omdat deze technieken niet in 1 dier uit te voeren zijn.

Intravitaal microscopie

Toename van het aantal doorbloede haarvaten [REDACTED] van ratten [REDACTED] met een behandeling gericht op het stimuleren van [REDACTED] $4,85 \pm 1,89$ vs [REDACTED] met behandeling $7,70 \pm 3,19$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (7,70 - 4,85) = 2,85$$

$$\text{variantie } \sigma = 2,54$$

$$(n/2)^{1/2} = 2,89 \rightarrow n = 17$$

Met een alfa van 0.05 en beta van 0.9 komen wij dan uit op 17 ratten per groep. Met een uitval van 30% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] zijn 22 ratten per groep noodzakelijk.

→ De moleculaire analyses worden ook in deze groepen ratten uitgevoerd, zodat hiervoor geen extra ratten nodig zijn.

Extravasatie van blauwe kleurstof

Afname van extravasatie van de blauwe kleurstof in de longen van ratten [REDACTED] met een behandeling gericht op het stimuleren van [REDACTED] $29,40 \pm 15,78$ vs [REDACTED] met behandeling $19,05 \pm 6,82$

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (29,40 - 19,05) = 10,35$
variantie $\sigma = 11,3$
 $(n/2)^{1/2} = 3,54 \rightarrow n = 25$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 25 ratten per groep. Met een uitval van 30% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] zijn 33 ratten per groep noodzakelijk.

Contrast echografie

Het meten van de doorbloeding met contrast echografie [REDACTED] is nog niet eerder gepubliceerd. Daarom is de poweranalyse gebaseerd op artikel van een andere onderzoeksgroep. (Lin Q, J Med Ultrason 2015; 42(2):199-205) Zij vonden een afname in TTP (maat voor de doorbloeding van de nieren) in ratten [REDACTED]: controle $7,5 \pm 5,0$ vs [REDACTED] $18,5 \pm 8,8$ sec.

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (18,5 - 7,5) = 11$
variantie $\sigma = 6,9$
 $(n/2)^{1/2} = 2,03 \rightarrow n = 9$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 9 ratten per groep. Met een uitval van 30% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] zijn 12 ratten per groep noodzakelijk.

Twee-foton microscopie

Er zijn nog geen analyses gedaan met betrekking tot het lekken van de haarvaten in de nier [REDACTED]. Daarom is de poweranalyse gebaseerd op een artikel van een andere onderzoeksgroep. (Sharfudding A, J Am Soc Nephrol 2009; 20: 524-534) Zij vonden een afname van het lekken van de haarvaten in ischemische nieren van ratten na behandeling in vergelijking met onbehandelde ischemische nieren: controle $5,25 \pm 4,50$ vs [REDACTED] $0,50 \pm 0,62$

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (5,25 - 0,50) = 4,75$
variantie $\sigma = 2,56$
 $(n/2)^{1/2} = 1,75 \rightarrow n = 7$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 7 ratten per groep. Met een uitval van 30% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] zijn 10 ratten per groep noodzakelijk.

Onderzoeksvraag 3

A: zie onderzoeksvraag 2

B: De poweranalyse is gebaseerd op artikel van een andere onderzoeksgroep. [REDACTED] Zij vonden een toename in het circulerend creatinine (markers voor nierschade) in ratten [REDACTED]: controle $19,33 \pm 3,77$ vs. [REDACTED] $64,50 \pm 33,14$

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (64,50 - 19,33) = 45,17$
variantie $\sigma = 18,46$
 $(n/2)^{1/2} = 1,32 \rightarrow n = 4$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 4 ratten per groep. Met een uitval van 40% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] en de overleving na het bij komen uit de narcose zijn 6 ratten per groep noodzakelijk.

B. De dieren

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

Gekozen is om de onderzoeksvragen te beantwoorden in mannelijke Wistar ratten afkomstig van een erkende leverancier. De ratten zullen een gewicht hebben tussen de 375 en 425 gram in verband met hun circulerend volume. [REDACTED]

Dit is tevens de reden dat het onderzoek uitgevoerd wordt in ratten. Op het moment bestaat er geen [REDACTED] waardoor wij genoodzaakt zijn om het onderzoek in ratten uit te voeren.

Er is gekozen voor ratten van het mannelijke geslacht, omdat het meten van de doorbloeding in de haarvaten wordt gedaan met behulp van intravitaal microscopie [REDACTED]

Daarnaast is in de literatuur niets bekend is over mogelijke verschillen tussen beide geslachten na

Tabel 1: Overzicht van de benodigde ratten

	Techniek	Doel	Aantal groepen ¹	Ratten per groep ²	Aantal interventies ³	Terminatie momenten ⁴	Totaal aantal ratten ⁵
1	Moleculaire analyses + intravitaal microscopie	Moleculaire veranderingen	2	7	0	2	28
2	Intravitaal microscopie + moleculaire analyses	Doorbloeding & moleculaire veranderingen	2	22	6	2	528
	Extravasatie EB	Vaatlekkage	4 (incl controle groepen vraag 1)	33	6	1	792
	Contrast echo	Doorbloeding	4 (incl controle groepen vraag 1)	12	6	1	288
	Twee-foton microscopie	Doorbloeding & vaatlekkage	4 (incl controle groepen vraag 1)	10	6	1	240
3A	Intravitaal microscopie + moleculaire analyses	Doorbloeding & moleculaire veranderingen	2	22	3	1	132
	Extravasatie EB	Vaatlekkage	2	33	3	1	198
	Contrast echo	Doorbloeding	2	12	3	1	72
	Twee-foton microscopie	Doorbloeding & vaatlekkage	2	10	3	1	60
3B	Moleculaire analyses	Schade markers & moleculaire veranderingen	2	6	3	1	36
						Totaal:	2374

¹ Aantal groepen op basis van figuur 2

² Ratten per groep gebaseerd op de poweranalyse

³ Modulaties binnen moleculaire systemen. Het aantal interventies is geschat op 6 en 3 op basis van ervaring, literatuur, tijd en capaciteit van de onderzoeksgroep.

⁴ Terminatie momenten: direct en 1 uur (figuur 2)

⁵ Totaal aantal ratten: 1*2*3*4

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 bestuderen van het lekken en de doorbloeding van de haarvaten

█ in mensen is zeer complex. De daadwerkelijk belangrijke vaatbedden, zoals in de nieren en longen, zijn dikwijls niet toegankelijk. Daarom zijn dierproeven essentieel voor dit onderzoek en kunnen niet worden vervangen. Daarnaast is de toediening van de meeste interventies in patiënten nog zeer experimenteel, en zijn meer dierstudies nodig om de effecten op de doorbloeding van deze middelen te kunnen bestuderen. Vervanging van de dierproeven door middel van celkweken is naar onze mening niet mogelijk, omdat er geen celkweek modellen bestaan die de complexe interactie van de bloedstroom, de binnenbekleding van de haarvaten en orgaanschade nabootsen. Om die reden is er naar ons weten geen alternatief voor de hier voorgestelde dierproeven.

Vermindering

Binnen de studie hebben wij voor technieken gekozen die in één dier op verschillende tijdstippen kunnen meten. Hierdoor kunnen wij de effecten █ bepalen en vervolgens de effecten op lange termijn, zodat er geen extra groep ratten nodig is. Daarnaast is het mogelijk om een meerdere technieken in één dier te combineren, wat leidt tot vermindering van het aantal ratten. Door bijvoorbeeld na terminatie de organen uit de ratten die gebruikt worden voor intravitaal microscopie te isoleren, is het niet nodig hier extra dieren voor te includeren. Ten slotte zijn het aantal ratten per groep door een poweranalyse tot een minimum beperkt.

Verfijning

Wij hebben getracht het ongerief zo laag mogelijk te houden door alle handelingen onder adequate narcose en pijnstilling te laten plaatsvinden, en de experimenten dusdanig te ontwerpen dat het dier tijdens de narcose wordt getermineerd (1, 2 en 3A). Bij de laatste stap (3B) zullen wij de ratten bij laten komen uit de narcose, maar deze ratten zullen adequate pijnstilling krijgen om het ongerief zo gering mogelijk te houden. De laatste stap voeren wij uit om de vergelijking met de humane situatie zo groot mogelijk te maken aangezien patiënten █ pas na enkele dagen orgaan schade zullen ontwikkelen.

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

Alle handelingen vinden plaats onder adequate narcose en pijnstilling. Bij onderzoeksvragen 1, 2 en 3A zullen de ratten niet bijkomen uit de narcose. Bij onderzoeksvraag 3B zullen de ratten wel bijkomen uit de narcose, maar zal adequate pijnstilling worden toegediend in de postoperatieve periode om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden.

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.

Voorheen hebben wij laten zien dat █ leidt tot verstoringen in de doorbloeding van de haarvaten █ en dat het █ systeem hierbij betrokken is. Deze resultaten vormen de basis van deze vervolg aanvraag. Wij hebben financiering ontvangen om onze eerder bevonden resultaten te bestuderen in verschillende klinisch relevante organen en de lange termijn effecten van het moduleren van het █ systeem. Dit onderzoek is nog niet eerder uitgevoerd in deze en andere patienten populaties.

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?

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?

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

nvt

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

Alle handelingen vinden plaats onder adequate narcose en perioperatieve pijnstilling. Voor de operaties wordt er plaatselijk verdoving gegeven. Zodra er een arterie lijn aanwezig is wordt er aanvullend elke 20 minuten pijnstilling toegediend. Vervolgens worden de ratten de gehele procedure gemonitord. Op basis van veranderingen in hartslag en bloeddruk worden zowel de narcose als pijnstilling aangepast. Ruime expertise is aanwezig om de veranderingen in hartslag en bloeddruk adequaat te interpreteren. De ratten uit onderzoeksvragen 1, 2 en 3A worden onder narcose en pijnstilling getermineerd. Op het moment dat de ratten bijkomen uit de narcose (onderzoeksvraag 3B) wordt in de postoperatieve periode adequate pijnstilling toegediend om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Alle handelingen vinden plaats onder algehele narcose en met adequate pijnbestrijding. Eén procent van de ratten kunnen ongerief ondervinden door het ontwikkelen van acuut nier- of long falen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1,5% procent van de ratten zullen bijkomen uit de algehele narcose, hiervan zal minder dan 1/3 schade aan de longen of nieren ontwikkelen ten gevolge van ██████████.

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

Humane eindpunten zullen worden gehanteerd.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Alleen bij onderzoeksvraag 3B zullen wij humane eindpunten hanteren omdat de ratten zullen bijkomen uit de narcose. Ondanks dat de ratten behandeld worden volgens de standaard klinische procedure en adequate pijnstilling in de postoperatieve periode zullen krijgen is het mogelijk dat de ratten een ongunstige prognose hebben. Wij hanteren als humane eindpunten de volgende criteria: een gewichtsverlies van 15%, verminderde activiteit, gebogen rug en een onverzorgde vacht.

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

Er is laten zien dat 100% van de ratten overleven voor 2 uur na [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED] Wij willen de ratten voor 7 dagen vervolgen en hebben daarom de uitval op 10% geschat.

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.

Voor onderzoeksvragen 1, 2 en 3A wordt het ongerief geschat op terminaal (zie tabel 2). Het betreft een experiment dat gevolgd wordt door terminatie waarbij alle handelingen plaats vinden onder narcose en adequate pijnstilling. Het ongerief voor de ratten bestaat uit het éénmalige ondergrondse transport van het proefdiercentrum naar het onderzoeksgebouw en het onder narcose brengen van de ratten.

Voor onderzoeksvraag 3B wordt het ongerief geschat op matig (zie tabel 2). Deze ratten zullen niet getransporteerd worden naar een andere faculteit. De ratten worden onder narcose gebracht en alle handelingen zullen plaatsvinden onder algehele narcose en adequate pijnstilling. Vervolgens zullen de ratten bijkomen uit de narcose en worden voor 7 dagen vervolgt onder postoperatieve pijnstilling waar nodig. Voor terminatie worden de ratten nogmaals onder narcose gebracht.

Tabel 2: Ongerief classificatie

(1, 2, 3A, 3B: onderzoeksvragen / % = percentage ratten die handeling ondergaan

Soort ongerief	Stap 1		Stap 2		Stap 3A		Stap 3B	
	%	n	%	n	%	n	%	n
Transport van huisvesting naar lab	100	28	100	1848	100	462		
Inductie narcose	100	28	100	1848	100	462	100	36
Bijkomen narcose							100	36
Pijnstilling i.p.							100	36
Opnieuw narcose voor terminatie							100	36
Cumulatief ongerief	Terminaal		Terminaal		Terminaal		Matig	

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De organen en het bloed worden gebruikt voor moleculaire analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

x Ja

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

Het NVWA nummer is 11400

2. Titel van het project:

Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten

3. Titel van de NTS:

Herstel van lekkende haarvaten om de doorbloeding van organen te verbeteren en orgaanschade te voorkomen

4. Type aanvraag:

Nieuwe aanvraag projectvergunning

5. Contactgegevens DEC:

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

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

- ontvangen door DEC: *30-03-2017*
- aanvraag compleet: *30-03-2017*
- in vergadering besproken: *11-04-2017*
- anderszins behandeld: *n.v.t*
- termijnonderbreking(en) van / tot: *12-04-2017 tot 03-05-2017 en 19-05-2017 tot 24-05-2017*
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
- aanpassing aanvraag: *24-05-2017*
- advies aan CCD: *12-06-2017*

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

-Datum advies IvD: *30-03-2017*

-Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*

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

9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *12-04-2017*

- Strekking gestelde vragen: *1. Bij NTS en voorstel onderdeel 3.1 om hoeveel patiënten gaat het hier? Graag meer informatie over de huidige stand van zaken, wat is precies de translationele waarde van dit onderzoek? 2. Veel spelling en taalfouten 3. Bij voorstel 3.4.1 Kan er niet meer in vivo (vervanging) gedaan worden? Kan men experiment 1 niet in celkweek doen? Waarom niet? 4. Graag*

een onderbouwing toevoegen bij de keuze voor de modellen. 5. Bij 3.4.2. en 3.4.3 de dieren zullen bijkomen na de narcose, dit is niet duidelijk weergegeven, graag toevoegen. 6. Bij de bijlagen dierproeven graag de titel veranderen, het gaat het om de techniek. 7. De beoogde behandelingen in de bijlagen moeten duidelijker worden weergegeven, waarop is het aantal interventies gebaseerd? 8. Bij D, vermindering moet men beter onderbouwen.

- Datum antwoord: 03-05-2017

- Strekking van de antwoord(en): 1. acuut falen van de nier (1 op de 7 patiënten) en acuut falen van de long (1 op de 6 patiënten) 2. Gedaan 3. De huidige behandeling van deze patiënten is gericht op de macrocirculatie, zoals het herstellen van de bloeddruk en de hartslag. Maar juist verstoringen in de microcirculatie (haarvaten) zijn een belangrijke voorspellende factor voor het ontwikkelen van orgaanfalen in ernstig zieke patiënten. Helaas bereikt de huidige therapie van deze patiënten nog niet de haarvaten. Door de complexe interactie van systemen is dit niet mogelijk met celkweek te bestuderen. 4. Ernstig zieke patiënten zijn patiënten [REDACTED]

[REDACTED] Wij hebben gekozen om de eerste twee patiëntpopulaties te bestuderen. De derde patiëntpopulatie, [REDACTED] wordt uitgebreid bestudeerd door een andere onderzoeksgroep waar wij intensief mee samenwerken. 5. Aangevuld in het projectvoorstel. 6. Gedaan 7. Het aantal interventies is geschat op 6 en 3 op basis van ervaring, literatuur, tijd en capaciteit van de onderzoeksgroep. De interventies zullen gekozen worden op basis van de uitkomsten in onderzoeksvraag 1 en kunnen 1, maar ook meerdere subsystemen betreffen. 8. Daarnaast is het mogelijk om verschillende technieken in één dier te combineren, wat leidt tot vermindering van het aantal muizen. Door bijvoorbeeld na terminatie de organen uit de muizen die gebruikt worden voor intravitaal microscopie te isoleren, is het niet nodig hier extra dieren voor te includeren.

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

Vraagronde 2

- Datum: 19-05-2017

- Strekking gestelde vragen: 1. Is het nog mogelijk om iets te zeggen over het aantal ernstig ziek patiënten dat jaarlijks in NL ziekenhuizen baat zou kunnen hebben bij deze behandeling? 2. Verder zou de DEC nog graag willen weten op welke patiënten er nu medicatie (waarvan de werking in eerder onderzoek is aangetoond) wordt getest om de microcirculatie te bevorderen. 3. Graag in de bijlagen de aantallen narekenen en bij onderdeel I toevoegen dat er kans is op orgaanfalen.

- Datum antwoord: 24-05-2017

- Strekking van de antwoord(en): 1. In Nederland ontwikkelen jaarlijks 2150 patiënten nierfalen en 2500 patiënten longfalen [REDACTED]. Het is niet bekend hoeveel patiënten [REDACTED] per jaar in Nederland. Wel is bekend dat deze patiënten een kans hebben van 1 op 7 en 1 op 6 op het ontwikkelen van nier- en longfalen, respectievelijk. 2. Wij zijn bezig met het opstarten van een klinische studie om de effecten van [REDACTED] op de doorbloeding van de haarvaten in patiënten [REDACTED] te bestuderen. Helaas zijn er ook negatieve effecten van [REDACTED] bekend en vervolg onderzoek blijft daarom nodig. De [REDACTED] medicatie zit nu in een fase 1 trial en de toekomst zal uitwijzen of dit nieuwe medicijn daadwerkelijk door kan stromen naar een fase 2 trial en verder. 3. De aantallen en onderdeel I zijn aangepast. Eén procent van de dieren kan ongerief ondervinden door het ontwikkelen van acuut nier- of long falen.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *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., geen van de DEC leden is betrokken bij dit project.*

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 individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande is de DEC 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).: n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. 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.

Een slechte doorbloeding van de haarvaten is kenmerkend bij ernstig zieke patiënten. Dit zijn bijvoorbeeld patiënten [REDACTED]. Een slechte doorbloeding van de haarvaten in deze patiënten kan leiden tot schade aan de nieren en/of de longen. De hypothese is dat de doorbloeding verslechtert doordat de haarvaten gaan lekken. Gezonde bloedvaten hebben een speciale "binnenbekleding" die de vaten waterdicht houden. Beschadigde haarvaten kunnen gaan lekken doordat de binnenbekleding van de vaatjes te poreus wordt door bv. [REDACTED]. Er bestaat momenteel geen effectieve behandeling gericht op het voorkomen of herstellen van de schade aan de haarvaten.

Het directe doel van deze studie is het ontrafelen van de moleculaire systemen die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten. Wanneer er in kaart is gebracht welke eiwitten belangrijk zijn kan men de activiteit van deze eiwitten stimuleren of remmen om te onderzoeken of hiermee de doorbloeding herstelt, wat het effect is op langere termijn en of het orgaanfalen vermindert. Het

uiteindelijke doel van de studie is om nieuwe medicijnen te ontwikkelen die ervoor zorgen dat de haarvaten minder lekken en die de doorbloeding van de haarvaten verbetert om zo de kans op orgaanfalen te verminderen. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de (ernstig zieke) patiënten. De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De fundamentele kennis zal bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe medicijnen om het lekken van haarvaten, [REDACTED] bij ernstig zieke patiënten, te verminderen.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: *n.v.t*

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder, en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van medicijnen om het lekken van haarvaten en de kans op orgaanfalen te verminderen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opbouw en de financiële ondersteuning.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.

10. 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.

De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Alle handelingen bij de acute experimenten vinden plaats onder adequate narcose en pijnstilling, het ongerief is hierbij terminaal. Bij de lange termijn experimenten vinden de handelingen plaats onder narcose, maar zullen we dieren bijkomen uit de narcose, hetgeen met matig ongerief gepaard gaat. Tevens kunnen deze dieren orgaanfalen ontwikkelen. Dit geldt voor een klein deel van zowel de muizen als de ratten. Het cumulatieve ongerief is voor 96-98% terminaal en voor 2-4% van de dieren matig. Voordat de dieren meer dan matig ongerief zullen ondervinden worden de humane eindpunten toegepast.

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.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren onder anesthesie gaan en omdat de dieren worden gedood. Daarnaast zal bij een klein deel van de dieren bijkomen uit de narcose, waarbij er kans is op orgaanfalen.

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.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht en het gedrag van de dieren of wanneer de dieren niet herstellen na de operatie.

Alleen bij onderzoeksvraag 3B zijn er humane eindpunten van toepassing, omdat de dieren dan bijkomen uit de narcose. Ondanks dat de dieren behandeld worden volgens de standaard klinische procedure en adequate pijnstilling krijgen, is het mogelijk dat de dieren last krijgen van orgaanfalen. Indien dit optreedt zullen deze dieren gedood worden. De overige humane eindpunten zijn: een gewichtsverlies van 15%, verminderde activiteit, gebogen rug en een onverzorgde vacht. De kans hierop is <5% muizen en 10% bij ratten. De humane eindpunten zijn niet van toepassing bij de terminale experimenten.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe

Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Het bestuderen van de haarvaten in ernstig zieke patiënten is zeer lastig vanwege de complexe interactie van diverse systemen in het lichaam, zoals de bloedstroom, de binnenbekleding van de haarvaten en het ontstaan van schade in de organen. Deze complexe interactie maakt vervanging van de dierproeven door celweek onmogelijk, omdat er (nog) geen celweek modellen zijn die deze complexe interactie nabootsen. Daarnaast is de toediening van de meeste interventies in patiënten nog zeer experimenteel, en zijn meer dierstudies nodig om de effecten (op de doorbloeding) van deze middelen te kunnen bestuderen.

De keuze voor het gebruik van muizen en ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd.

Men gebruikt ratmodellen voor de

voor het model gebruikt men de muis, omdat deze makkelijker genetisch te modificeren is dan de rat. De onderzoekers hebben met beide modellen veel ervaring.

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.

In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Bovendien is de proefopzet erop gericht om zoveel mogelijk analyses te doen in een dier (verschillende technieken en tijdstippen).

Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1878 muizen en 2374 ratten en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

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.

Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe: *n.v.t.*

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

Alleen mannelijke dieren zullen worden gebruikt. Er is gekozen voor het gebruik van mannelijke muizen en ratten, omdat het meten van de doorbloeding in de haarvaten wordt gedaan met behulp van in vivo microscopie

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.

Na het doden van de dieren zal men de organen en het bloed gebruiken voor moleculaire analyses. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.

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?

De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag: Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de moleculaire systemen die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten en het ontwikkelen van nieuwe medicijnen tegen het lekken het gebruik van maximaal 1878 muizen en 2374 ratten, die daarvan terminaal tot matig ongerief ondervinden?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af.

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden terminaal tot maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel

wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van een nieuwe medicijnen om het lekken van haarvaten en zo orgaanfalen te verminderen.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 1878 muizen en 2374 ratten, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van kennis over de moleculaire systemen die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten, is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het verkrijgen van kennis over moleculaire systemen die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een nieuwe medicijnen is afgewogen tegen het, minimaal tot matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 1878 muizen en 2374 ratten, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Er is sprake van een substantieel maatschappelijk belang en een reëel wetenschappelijk belang. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over het lekken van de haarvaten en zullen mogelijk bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling hiervan.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk belang en het reële wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 1878 muizen en 2374 ratten en het daarbij verwachte terminale tot maximaal matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Er is geen dilemma geconstateerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1140020172144
Bijlagen
2

Datum 13 juni 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 juni 2017. Het gaat om uw project "Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1140020172144. 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 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020172144






Datum:
13 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020172144

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 64156338
Straat en huisnummer: De Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
IBAN: NL69RAVO1025169891
Tenaamstelling van het rekeningnummer: VUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
13 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020172144

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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



Gegevens gemachtigde

Naam:
Adres:
Postcode en plaats:
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?



Wat mag de gemachtigde doen?

- Ja
- 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 september 2017
Geplande einddatum: 31 augustus 2022
Titel project: Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten
Titel niet-technische samenvatting: Herstel van lekkende haarvaten om de doorbloeding van organen te verbeteren en orgaanschade te voorkomen
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:

13 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020172144

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Amsterdam
Datum: 12 juni 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum



Van der Boechhorststraat 1117

1081 HV AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1140020172144

Bijlagen

2

Datum 13 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 13 juni 2017

Vervaldatum: 13 juli 2017

Factuurnummer: 172144

Ordernummer: 4684861

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1140020172144	€ 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.

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 28 juni 2017 9:12
Aan: 'Info-zbo'; [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD1140020172144

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Hartelijk dank voor uw vraag. Wij hebben gekozen om voor de andere experimenten ook mannelijke dieren in te zetten. De reden hiervoor is dat oestrogenen van grote invloed zijn tijdens bv. een [REDACTED]. Door deze hormonale invloed kunnen wij de onderlinge metingen niet meer met elkaar vergelijken. Als wij voor vrouwelijke dieren kiezen betekent dit dat wij dit voor alle experimenten moeten doen, maar ook mannelijke dieren als controle groep moeten inzetten om de invloed van oestrogenen op de doorbloeding van de haarvaten te bestuderen. Dit zal resulteren in een verdubbeling van het aantal dieren.

Ik hoop dat uw vraag hiermee voldoende beantwoord is. Indien er nog meer vragen zijn dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

VU University Medical Center, [REDACTED]
 [REDACTED] / www.vumc.com



De Boelelaan 1117, [REDACTED]
 1081 HV, Amsterdam, the Netherlands

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 27 juni 2017 15:39
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: vraag bij de behandeling van AVD1140020172144

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning gedaan. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een vraag. Het betreft uw project AVD1140020172144 getiteld: 'Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten'. U beschrijft het inzetten van mannelijke muizen omdat bij Intravitaal microscopie de doorbloeding van de haarvaten wordt gemeten [REDACTED]. Deze techniek wordt niet in alle dieren toegepast, kunt u bij de andere technieken ook uitsluitend mannelijke dieren inzetten of zou het ook mogelijk zijn voor die dieproeven vrouwelijke dieren in te zetten.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Namens **Centrale Commissie Dierproeven**
www.centralecommissiedierproeven.nl

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1140020172144
Bijlagen
1

Datum 18 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 13 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten" met aanvraagnummer AVD1140020172144. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 28 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd de keuze voor het inzetten van mannelijke dieren te onderbouwen. Uw antwoorden zijn bij het dossier gevoegd deze hebben niet geleid tot aanpassingen in de formulieren.

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 "Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten" 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 Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op

12 juni 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:
18 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020172144

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).



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam

Adres: De Boelelaan 1117

Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten" met aanvraagnummer AVD1140020172144, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] [REDACTED]. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 12 juni 2017, ontvangen op 13 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 28 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 [REDACTED]				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	1.878	96% Terminal 4% Matig	
3.4.4.2 [REDACTED]				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	2.374	98% Terminal 2% Matig	

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
18 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020172144



Aanvraagnummer:

AVD1140020172144

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:
AVD1140020172144

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van 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:

AVD1140020172144

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.

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
nr.	documenten NTS20172205	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	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5			x					
9	Bijlage beschrijving dierproeven 6			x					
10	Bijlage beschrijving dierproeven 7			x					
11	DEC-advies				x		x	x	
12	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
13	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
14	Reactie verzoek aanvulling			x					
15	Advies CCD		x						x
16	Beschikking en vergunning				x		x	x	



Centrale Commissie Dierproeven

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in 30100
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	

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

KvK-nummer	40530817	
Straat en huisnummer	Plesmanlaan	121
Postbus	90203	
Postcode en plaats	1066 CX	Amsterdam
IBAN	NL71DEUT0626343534	

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[REDACTED]	
Afdeling	[REDACTED]	
Telefoonnummer	[REDACTED]	
E-mailadres	[REDACTED]	

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

(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie		
Afdeling		
Telefoonnummer		
E-mailadres		

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | Instantie voor 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 - 8 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 8 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Study of immune cells after infection and tumor challenge to uncover fundamental principles to improve immunotherapy
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Studie aan immuun cellen na infectie en tumor challenge om fundamentele principes te onttrafelen voor immunotherapie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------------------------------------------|
| Naam DEC | NKI |
| Postadres | t.a.v. [REDACTED]; Postbus 90203; 1006 BE Amsterdam |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 2.113,- Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[REDACTED]
Functie	Instantie voor Dierenwelzijn
Plaats	Amsterdam
Datum	12 - 6 - 2017
Handtekening	[REDACTED]



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.

T cells constitute an essential line of immune defense that mediates protection during viral infection in an antigen-specific manner. Upon infection, antigen-specific naive T cells expand and differentiate into

effector cells that contribute to viral clearance through granzyme B-driven cytotoxicity and production of the pro-inflammatory cytokine IFN- γ . T cells are also important after resolution of infection, because of their capacity to develop into memory cells that provide enhanced protection upon secondary encounter with the pathogen. Therefore, it is highly relevant to study how T cells are available to achieve up to life-long protection against re-infection.

T cells have also been found to infiltrate tumor tissue and to develop responses against tumors, but in such a setting they are often ineffective to combat disease in the absence of treatment. The underlying reason resides at least in part in the expression of inhibitory molecules such as PD1 and CTLA4 on these tumor-infiltrating T cells. The upregulated expression of inhibitory molecules on tumor-infiltrating T cells allows tumor cells to block the ability of these lymphocytes to eliminate tumor cells. In recent years, immunotherapy has emerged as a promising strategy in the treatment of cancer (Couzin-Frankel, *Science*, 2013, 'Breakthrough of the year 2013: Cancer immunotherapy'). In particular, immunotherapies that activate T cells have been found effective in the elimination of tumor cells. Checkpoint blockade therapy overcomes immune suppression through blocking antibodies that relieve inhibitory pathways through PD1 (pembrolizumab) and CTLA4 (ipilimumab). The efficacy of these therapies is thought to rely on the re-activation of suppressed T cell responses directed against the tumor cells. A second successful approach works through the re-infusion of in vitro expanded T cells derived from excised tumors. Tumor-infiltrating T cells can be expanded to large numbers in vitro and these cultured cells have been found to substantially accelerate the clearance of tumor cells. Both of these therapies highlight the importance of T cells for the treatment of cancer. Although these therapies have clear benefits and can completely clear disease in a substantial fraction of the patients, they do not work efficiently in other patients or in different types of cancer. Thus, further knowledge on T cell differentiation is required to improve T cell immunotherapy for cancer treatment.

As also noted above, an important pathway that suppresses T cell responses against tumor cells is mediated by the inhibitory receptor PD1 that is expressed on tumor-infiltrating lymphocytes and blockade of this pathway forms an effective immunotherapy in many cancer patients (Hamid et al., *N Engl J Med*, 2013). The identification of PD1 as a target for intervention in immunotherapy originates from infection experiments in mice with the LCMV virus (Barber et al., *Nature*, 2006). In the chronic model of LCMV infection PD1 is upregulated on virus-specific T cells and suppresses T cell responses against the virus. Treatment of LCMV infected mice with blocking anti-PD1 antibodies reinstates T cell responses that clear infection. The applicability of PD1 as a target for intervention in immunotherapy shows by example that the chronic infection model of LCMV can be instrumental to identify further targets for immunotherapy. Therefore, we aim to study T cell differentiation in chronic infection models such as with chronic LCMV variants. Obviously, differences exist between T cell responses in chronic infection and in tumor settings (e.g. due to the systemic presence of completely foreign T cell epitopes from the virus versus locally expressed self but potentially modified T cell epitopes from the tumor cells). Despite these differences, T cell responses against chronic infection and during tumor development are remarkably similar, suggesting that targets from chronic infection models can provide useful starting points for further study in tumor models.

As the development of efficient T cell responses is impaired in cancer patients and in in vivo mouse models of cancer, a different approach is required to study how T cells with high potential to eliminate tumor cells differentiate. Therefore, our second approach is to study how T cells develop in acute infection models, as these models have been instrumental in the understanding of the differentiation of effective T cell responses. Acute infection induces the formation of pathogen-specific effector T cells that contribute to pathogen clearance. After sterile immunity is achieved the T cell response contracts, but memory cells that can mount highly effective secondary responses upon re-encounter with the same pathogen remain. The ability of memory cells to persist in combination with their potential to develop highly specific responses makes them highly useful for therapeutic purposes in patients. Therefore, we are studying effector and memory T cell differentiation to unravel how T cell development is instructed by environmental and intrinsic cues, how naïve T cells differentiate into distinct subsets with unique properties, how effector functions are established, and how T cells engage other immune cells upon activation.

We aim to apply the fundamental knowledge gained in these chronic and acute infection models to find immunization strategies and in vitro culture protocols to generate effector or memory T cells with high potential to combat infection and / or tumor growth. Our research is designed to ultimately understand how the qualities of effector and memory T cells can be optimally used in therapy for treatment of infection and / or cancer.

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 ultimate objective of this project is to assess novel and improved strategies for T cell immunotherapy and to translate these findings to a human cancer or infection setting. Obviously, development of therapies to extend the survival of cancer or infection patients form a long-term goal that is unachievable within the 5 years of this project. Nevertheless, we expect that our work on this project will contribute to substantial improvements in our understanding of T cell differentiation that is essential for the further development of T cell immunotherapy.

We aim to expand our knowledge on T cell differentiation using the study of memory T cells that develop after infection with influenza, lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) or the bacterium *Listeria monocytogenes* (Lm). These infection models are chosen as they have been used in the past in our lab and many other labs to study T cell differentiation. This has resulted in a wealth of knowledge, availability of important tools and expertise that strongly supports further work on these infection models. We will focus on how T cell differentiation is influenced by internal cues (transcription factors, histone modifying enzymes, RNA binding factors) and external cues (signals from antigen-presenting cells, other immune cells, or stromal cells). We will study the different aspects of the memory T cells that include longevity and turnover, metabolism, migration, the ability to form secondary responses, the acquisition of effector functions, and their potential to activate or inhibit the actions of other immune cells. We will make use of these findings to recapitulate formation of memory T cells with desired properties in cell cultures. These in vitro expanded memory T cells will be tested for their potential in vivo to protect against infection and tumor challenge.

In this project, we expect to achieve our goals in a stepwise manner. First, we will identify target genes of memory T cells in primary infection models (milestone 1). To identify target genes of interest we will consider intrinsic signals in T cells and extrinsic signals from the environment. Of utmost importance for the selection of relevant target genes is that they contribute to the differentiation, expansion and / or acquisition of effector functions of T cells as mentioned in further detail in our research strategy under point 3.4. Next, we will analyze the role of these target genes in the efficacy of memory cells to respond in re-challenge settings upon re-encounter with the same pathogen (milestone 2) or upon tumor challenge (milestone 3). Finally, immunization strategies to induce memory T cells or adoptive transfer strategies with cultures of memory T cells will be developed based on the acquired information to establish protocols that can achieve clearance of infection or tumor cells (milestone 4).

These milestones appear achievable in light of past accomplishments. We have extensively contributed to the understanding of T cell differentiation through our in vivo work on infection models. For example, we have previously described the role of costimulation through TNF related molecules such as the CD70-CD27 and GITRL-GITR ligand-receptor pairs in the establishment of T cell responses (Van Gisbergen et al., 2011, *Immunity*; van Olfen et al, 2009, *Ji*; Pascutti et al, 2015, *PLOS Pathogen*). We have also addressed the transcriptional regulation of anti-viral T cell responses and found how transcription factors such as Notch and Hobit instruct the formation of effector and memory T cell responses (van Gisbergen et al, 2012, *Nat. Immunol.*; Backer et al, 2014, *Nat. Immunol.*; Hombrink et al, 2016, *Nat. Immunol.*; Mackay et al., 2016, *Science*). In addition, we have a team of skilled researchers in the field of infection and tumor immunology and labs that have state of the art equipment enabling adequate analysis of immune responses using flow cytometry, microscopy, mass spectrometry and molecular techniques.

We anticipate that establishing these milestones allows us to introduce improvements to the longevity, proliferative capacity and / or the effector functions of cultured T cells to further unlock these cells for use as therapeutic products. Currently, we participate in ongoing immunotherapy trials on the use of tumor-infiltrating lymphocytes in cancer patients and hold a competitive position in cellular

immunotherapy, as the lab contains one of the production centers of tumor-infiltrating T cells for adoptive transfer into melanoma patients in Europe. This means that the expertise and facilities for follow-up research are in place within our institute. Therefore, translation of our in vivo mouse studies into a clinical setting can be implemented on site for the improvement of existing products of tumor-infiltrating lymphocytes and the development of novel T cell products.

3.3 Relevance

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

Scientific:

In the past years large steps have been made in the understanding of how T cell responses against the tumor are suppressed during cancer formation. This has resulted in the identification of many targets including PD-1 and CTLA4 that can now be exploited for the treatment of cancer patients. In addition, substantial progress has been made in the use of in vitro expanded T cells as cellular products for the treatment of cancer patients. This is in particular the case for melanoma patients, as complete responses have been achieved in a large proportion of these patients using adoptive T cell therapy. Collectively, these studies suggest that T cells are not only essential in protection against viruses and other pathogens, but can also be applied in therapies that are effective in protection against cancer. Therefore, it is of pivotal importance to improve our fundamental understanding of T cell differentiation to identify and validate further targets in order to design good clinical studies and to ultimately establish better strategies to apply T cells for the treatment of cancer or infection patients.

Social:

Health and well-being are generally considered to be of primary value by the population. Cancer and infectious disease are factors that have a very negative impact on the health and well-being of many people, not only for patients, but also for their relatives and friends. Moreover, the loss of lives and morbidity also has considerable negative economic consequences (high cost of care, loss of productivity). This project can provide fundamental understanding of T cell differentiation to establish better T cell therapy that reduces adverse effects, morbidity, and mortality and may therefore be of importance to patients that will benefit from these therapies.

3.4 Research strategy

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

The aim of the project is to identify targetable properties of T cells that are potentially useful to optimize T cell therapy in cancer or infection patients using a large set of experiments. We will focus on different aspects of T cell differentiation outlined below to search for such targets.

Research Topics:

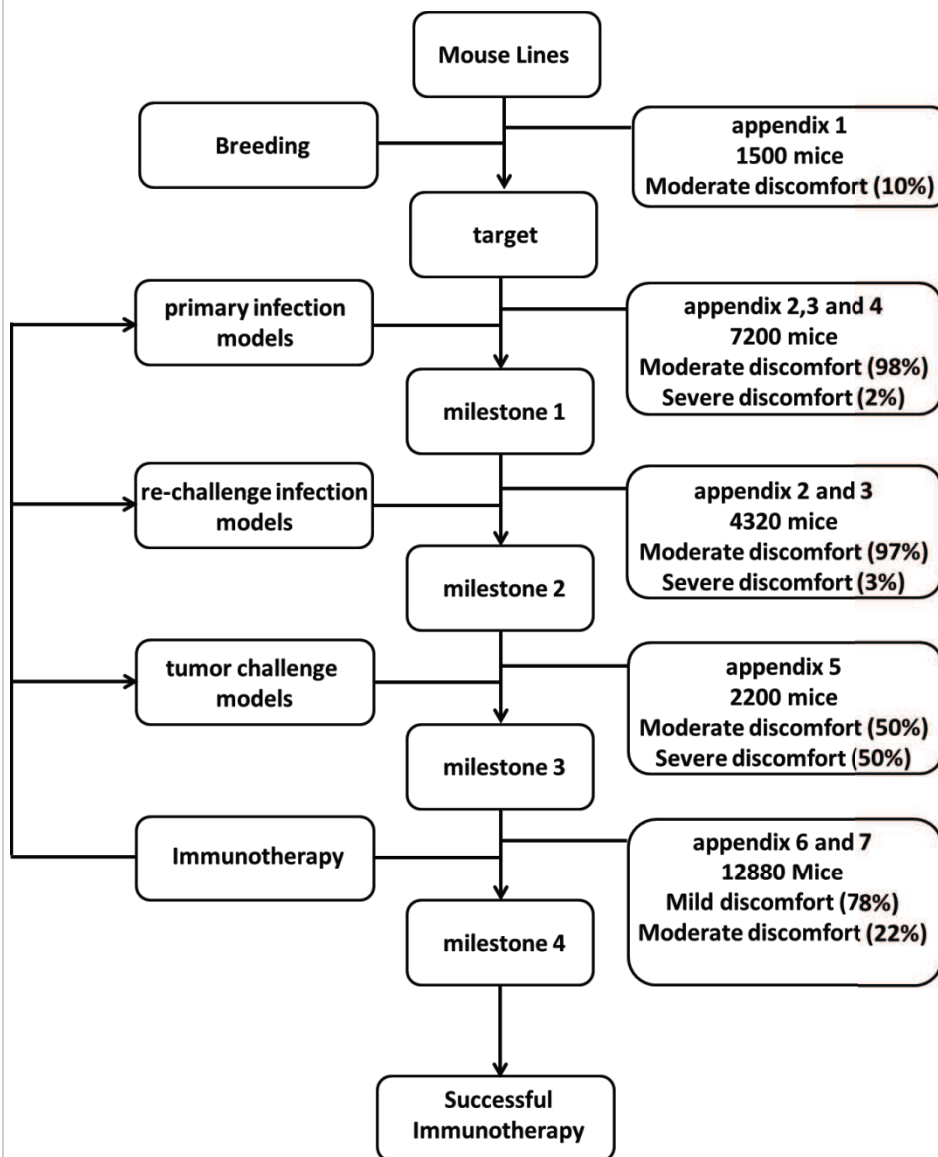
1. Identification of intrinsic signals in T cells that drive T cell differentiation. This line of research concerns transcription factors and target genes of these transcription factors that regulate T cell development and function. Others and we have found that transcription factors play an essential role in the development of the different subsets of effector and memory T cells that arise during an immune response. The instrumental role of these transcription factors can be applied to induce the differentiation of memory T cells with desired properties. In addition, this line of research concerns RNA-binding proteins that regulate effector function of memory T cells through RNA stability. Others and we have found that RNA stability and translation play a very important role in the regulation of effector functions of memory T cells. We envision that RNA-binding proteins can be utilized to enhance the effector functions of memory T cells.

2. Identification of extrinsic signals that T cells acquire for example from antigen-presenting cells, other immune or stromal cells to differentiate into effector or memory cells. Others and we have shown that antigen (signal 1) in combination with co-stimulation (signal 2) and cytokines (signal 3) are important signals that T cells acquire from surrounding cells during their differentiation process in immune responses. These signals can be used to instruct the formation of effector and memory T cells with optimal properties for therapy.

These research questions will result in the identification of key molecules involved in T cell differentiation that may provide useful novel targets of intervention in immunotherapy against cancer. For this purpose, we will uniformly address the research questions using a standard set of experiments as outlined below under points 3.4.2 and 3.4.3. The analysis will make use of genetically modified mice that over-express, lack or label specific molecules or genes of interest. These genetically modified mice will be compared against the relevant wild-type mice of the same background. Alternatively, blocking or stimulating antibodies or small molecule inhibitors will be used to modulate any of the pathways of interest. The effect of these reagents will be tested against the appropriate control conditions.

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 different components of the project are aimed at understanding T cell differentiation by making use of a set of infection and tumor models, in which the formation, properties and potential of pathogen and tumor-specific T cells can be analyzed. Ultimately, these findings will be used to design novel immunotherapy strategies. These immunotherapies will then be tested for their efficacy against challenge in infection and tumor models. The general setup of the experiments is displayed in the flow chart depicted below.



We largely use existing mouse models for our infection experiments, but, if existing models are not

available, it is possible that the project requires the development of novel mouse models. In general these new models will not display discomfort under standard conditions, but in rare cases it can be necessary that mice are bred with discomfort to study targets of interest (**appendix 1**). The type of infection impacts on T cell differentiation. Important parameters that affect pathways of T cell differentiation are the duration and the location of the infection. Therefore, we aim to study T cell differentiation using pathogens that induce chronic versus acute infection and using pathogens that induce local versus systemic infection. We aim to establish T cell differentiation in local infection models using the influenza virus, which exclusively targets the lungs (**appendix 2**). T cell differentiation in systemic infection will be studied using either LCMV or Lm that both induce infection in multiple tissues (**appendix 3**). Chronic infection will be studied using variant viruses of LCMV that persist and that therefore induce the differentiation of exhausted T cells (**appendix 4**). The potential of memory CD8 T cells will be studied in re-challenge experiments. Re-challenge can be achieved in the influenza model (**appendix 2**) or through serial infection with LCMV and Lm containing the same T cell epitopes (**appendix 3**). In addition, the efficacy of memory T cells in a tumor challenge setting to clear the tumor cells will be studied (**appendix 5**). In vitro studies will be established to mimic the in vivo formation of memory T cells under culture conditions (**appendix 6**). Alternatively, immunization strategies will be applied to induce the formation of memory T cells in vivo (**appendix 7**). The in vitro or in vivo induced memory T cells will be probed for their protective potential after transfer into mice and upon challenge with pathogens or tumor cells (**appendices 2-5**).

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.

As outlined above, we aim to use different types of infection models to study T cell differentiation. These infection models will be run in parallel, as they are aimed at the understanding of the properties of pathogen-specific T cells under different conditions. Influenza infection (**appendix 2**) induces local infection in the lungs and can reveal different aspects of T cell differentiation than acute LCMV or Lm infection (**appendix 3**) that induce systemic infection. Similarly, the induction of chronic LCMV infection (**appendix 4**) creates a different setting, in which antigen and inflammation are constitutively present and will therefore be studied in parallel to the acute infection models. The choice between the type of infection model depends on which model provides the best possible chance of success in respect to what is known in the literature.

As depicted in the flow chart, in **step 1**, we will first analyze different time-points after primary infection within any of these models. This setup will allow analysis of effector T cell differentiation in early stages (first 2 weeks after infection) and memory T cell differentiation in late stages (more than 1 month after infection). If we find clear evidence that molecules of interest are involved in any of the aspects of effector or memory T cell differentiation (**milestone 1**), we will progress to the next step. In **step 2**, the efficacy of the memory T cells will be studied in pathogen re-challenge experiments. These experiments can be done in either of 2 ways. Mice will be re-challenged with a pathogen containing the same epitopes to enable analysis of the potential of the memory cells in a secondary response. Alternatively, pathogen-specific memory T cells will be adoptively transferred into recipients that will be challenged with the same pathogen. If in these experiments, we find clear evidence that the memory cells provide protection against secondary infection (**milestone 2**), we will progress to the next step. In **step 3**, the efficacy of the memory T cells will be studied in tumor challenge experiments (**appendix 5**). Similar to the previous step, if in these experiments we find clear evidence that the memory cells also provide protection against tumor challenge (**milestone 3**), we will progress to the next step. In **step 4**, we will analyze whether we can recapitulate the formation of protective effector or memory T cells through in vitro or in vivo manipulation. Such T cells will be induced during culture protocols (**appendix 6**). Alternatively, immunization strategies (**appendix 7**) will be developed to induce memory T cells in vivo. These immunotherapy strategies will then be tested for their efficacy to provide protection in infection and tumor models (**appendices 2-5**). If we are able to induce memory cells with protective capacities in vitro or in vivo, we have achieved the final goal of the project (**milestone 4**). We consider the ultimate goal of this protocol the establishment of successful immunotherapy that has protective potential in the in vivo infection and / or tumor models. Further studies will be required to validate the procedures to generate protective memory cells in different tumor models to ultimately translate these findings to the human setting. These protocols are not part of the current application, but of previously requested and granted protocols (e.g. the protocol entitled pre-clinical intervention studies in mice for prevention and treatment of cancer).

The project reflects ongoing work of our group that until this point has run within the old format of the animal ethics protocols. Therefore, we have parts of the project that have already reached 1, 2 or 3 of the milestones described above, and thus, it is possible that experiments under the current project start off immediately at step 1, 2, 3 or 4.

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	Breeding with discomfort
2	Local infection with influenza
3	Systemic infection with <i>Listeria monocytogenes</i> or LCMV
4	Chronic and acute LCMV infection
5	Tumor challenge
6	Homeostasis studies
7	Immunization
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	30100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	01	Breeding with discomfort

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.

We perform experiments on wildtype and transgenic mouse lines that are maintained through breeding in the facility. Most of our current lines are without discomfort. To study immune cell differentiation we are generating novel mouse lines that may have unanticipated discomfort. The breeding of mice with discomfort occurs for 2 reasons.

1. Breeding of lines with known discomfort for maintenance
2. Breeding of lines with known discomfort for experiments

In some cases, such as for the generation of new lines through genetic manipulation, through crossing of existing lines, or through crossing onto a different background (e.g. 129 mice onto C57Bl/6 mice) the discomfort during breeding is unknown. Therefore, the breeding of new lines will be monitored for discomfort for at least 2 generations to determine whether the mice display any signs of discomfort under standard conditions. If no signs of discomfort are apparent in the first 2 generations, the new lines will be considered without discomfort. If signs of discomfort are apparent, measures will be taken to overcome the discomfort. For example, if discomfort develops after a certain age, we will euthanize mice before development of discomfort. Furthermore, when discomfort requires a specific configuration of alleles, such alleles will be separated (or kept heterozygous) for line maintenance. If the discomfort cannot be overcome, the new lines will be considered breeding with discomfort and further breeding for maintenance and experiments will occur on this protocol.

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

Nature:

Breeding pairs will be set up with one male and one or two females to meet the minimal requirements for mice in maintenance of the lines or in production for experiments. Maintenance breeding requires low numbers of breeding pairs (typically 2 pairs) and production breeding requires high numbers of breeding pairs (typically 5 pairs). The number of production breeding pairs depends on usage of the mice in the experiments. It should be noted that the frequency of obtaining the desired genotypes in the offspring can be as low as 25%, if for example heterozygote parents are used for breeding, or well below 25%, if multiple genotypes have to be taken into consideration. These circumstances can necessitate a higher number of breeding pairs (above 5 pairs), reflecting the efficiency of obtaining the desired offspring.

In general, the lines with spontaneous discomfort will be maintained through breeding of heterozygotes with wildtypes, which eliminates the generation of homozygotes, which can be expected to have a more severe phenotype. For experimental purposes, the lines will then be maintained using heterozygote x heterozygote breeding pairs, enabling the formation of homozygote offspring (25%) and wild type littermates (25%) that can be used as controls.

Material will be obtained from the mice to identify the genotypes of the offspring. Toe clips will be taken at 1 week of age or earclips at 3 or more weeks of age to enable screening of the genotypes by PCR on genomic DNA. For certain genotypes, typing can only be done through analysis of blood samples. Therefore, we will toeclip or earclip these mice for identification purposes and subsequently draw blood samples at 3 or more weeks of age.

The generation of surplus mice will be kept at a minimum. It is impossible to completely avoid the generation of mice that are not required for maintenance and / or that cannot be used in experiments. During the crossing of lines the number of generated surplus mice can be substantial (e.g. 75%, if heterozygotes are mated to obtain homozygote offspring). These mice will be euthanized as soon as possible after the genotypes have been identified.

Breeding pairs will be terminated before the breeder mice reach 1 year of age and the breeder mice will then be sacrificed. New breeding pairs will be set up as replacements.

Frequency:

Breeding pairs will be mated until the female has had 6 litters.

Time:

Breeding pairs will be set up with mice of at least 8 weeks old. Breeding pairs will be retired after 6 litters or when the breeder mice are 1 year old.

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 depends on the requirements for maintenance, experiments and the efficiency of obtaining the desired genotypes. We will make use of optimal breeding strategies to meet these requirements as closely as possible and to minimize the number of surplus mice.

B. The animals

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

The animals are obtained from registered commercial or in-house suppliers or through in-house generation of new lines. Breeder mice can be wild-type or genetically modified animals of at least 8 weeks of age and at the most 1 year of age.

We expect to use up to 100 mice per line per year and 1 new line per year. This results in 5x 100 mice after five years for the first line if the line is not discontinued, 4x 100 mice for the second line, 3x 100 mice for the third line, 2x 100 mice for the fourth line and 1x 100 mice for the fifth line. Therefore, we expect to use 1500 mice in total on this protocol. Based on past experience of using genetically modified models in immune cell differentiation, we expect that most of the new lines are without discomfort and therefore do not need to be bred on the protocol.

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.

The breeding protocol supports the experiments described in the other appendices. Optimization of the breeding strategy to the experimental requirements will reduce the usage of mice. We can use males and females interchangeably in the majority of our experiments, which will optimize the usage of the mice obtained through breeding. In heterozygote breedings, the wild-type offspring will be used as littermate controls for the knockout offspring, which will also reduce the number of surplus mice.

When discomfort requires homozygosity for specific alleles, lines will be maintained heterozygously, which will avoid discomfort. For those lines where this is not the case, as many alleles will be maintained homozygously as possible without compromising experimental set up. For instance, mice will be bred homozygously for floxed alleles for maintenance purposes and crossed with hemizygous Cre mice (either on a homo- or heterozygous background for these same floxed alleles, depending on whether this causes discomfort) to generate experimental mice. This is the most parsimonious strategy to obtain sufficient experimental mice and limit discomfort.

Finally, when discomfort develops with age, mice will be sacrificed before reaching the critical age, unless they are needed for experiments in which the cause of discomfort is part of the experiment.

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

The animals will be housed in groups with cage enrichment to prevent stress. The animals will be closely monitored for discomfort (examining posture, tendency to isolate from the group, fur). Monitoring will occur on a weekly basis or more frequently, if discomfort has been identified. If a genetically modified mouse line appears to display discomfort associated with the genotype under normal breeding conditions, an adequate solution to diminish discomfort will be sought with the help of animal welfare experts. If discomfort develops after a certain age, mice will be euthanized before this age, unless this interferes with experimental demands (in which case they will fall under experimental protocols).

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.

Animals in this appendix will experience at most moderate discomfort. If spontaneous discomfort is higher, mice will be culled. If mice experience pain as part of the spontaneous discomfort, they will be culled. Analgesia is not feasible, as that would require constitutive administration of pain relief. Anesthesia with isoflurane will be applied during ear clipping.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We do not anticipate discomfort in most newly developed mouse lines, as we are mostly interested in genetic modifications that affect T cell differentiation. As functional effector or memory T cells are not essential in mice housed under SPF conditions, it is unlikely that our new mouse models will display discomfort associated with the genotype. However, it is possible that T cell defects result in the development of autoimmunity in some of the strains.

Explain why these effects may emerge.

Autoimmunity will develop in strains that are deficient for regulatory T cells. These cells prevent spurious activation of the immune system. Disease manifestations develop after the mice develop an adaptive immune system (T cells and B cells), and typically become overt after 12 days of age.

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

The mice will be once weekly monitored for discomfort. If signs of discomfort are apparent the mice will be more closely (up to once daily) monitored. If the signs of discomfort are recurrent in a substantial fraction of the mice, the line will be considered breeding with discomfort. In these cases, in close collaboration with the veterinarian measures to alleviate the discomfort of the mice will be considered. The mice will be terminated if the signs of discomfort exceed the humane endpoints defined below. When possible, mice will be euthanized before development of discomfort. If such measures are not effective to lower the discomfort below the thresholds of the humane endpoints, the line will be discontinued, unless the cause of discomfort is part of the study.

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.

We have defined the following humane endpoints:

- Loss of more than 20% body weight
- Severe breathing problems
- Severe ulceration of the skin
- Bloody stool

These humane endpoints are related to autoimmune disease that develops in mice lacking regulatory T cells.

Indicate the likely incidence.

The percentage depends on the genotype. For example in mice lacking regulatory T cells, discomfort may develop in 50% of mice due to the X-chromosomal defect in FoxP3 that only affects hemizygous males.

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').

We expect that most of the mice (90%) on this protocol will experience at most mild discomfort and some of the mice (10%) will experience moderate discomfort. Mice will be euthanized before development of severe discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	30100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 02	Type of animal procedure Local infection with influenza

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.

General design of animal procedures:

In order to study the immune response to local infection, the widely used acute infection model of influenza infection will be employed. Mice will typically be inoculated with influenza via intranasal routes under isoflurane anesthesia to establish infection. In some experiments other routes of infection will be employed (e.g. through intravenous or intraperitoneal injection).

We will infect naïve mice to study primary immune responses. We are interested in early timepoints (up to day 9 p.i.) to study innate responses, in the peak of the primary adaptive response at day 10 p.i. to study the formation of adaptive responses, in the contraction of the adaptive response (day 11 to 14 p.i.), and in the memory phase of the adaptive response after clearance of the infection (after day 14 p.i.).

We will infect immune mice to study recall responses. For this purpose, mice will be sequentially infected with the same or different strains of influenza. These distinct influenza strains contain the same internal T cell epitope, but different viral coat epitopes (e.g. HKx31 and A/PR8/34). In some cases, the mice will be sequentially infected with influenza and other pathogens that contain the same epitope (e.g. Flu-OVA and Listeria-OVA). These heterologous settings will ensure that memory T cells formed in the first response can respond to the re-challenge in the absence of neutralizing antibodies that immediately clear secondary infection. After the sequential infections, the recall immune response will be followed at similar time-points as displayed above for the primary immune response.

We will also employ an alternative approach to study primary and secondary responses using adoptive transfer of T cells. To study primary responses, naïve T cells of wildtype or TCR transgenic mice (e.g. OT-I or F5 mice), in some cases carrying additional genetically modified alleles, will be isolated and transferred using intravenous injection into recipient mice that will subsequently be infected with influenza. The mice providing donor cells for primary responses come from appendix 6. In this manner, the primary response of the donor antigen-specific T cells can be analyzed at

similar time-points as described above for endogenous T cells. To study secondary responses, memory or *in vitro* activated T cells of wildtype or TCR transgenic mice will be isolated and transferred using intravenous injection into recipient mice that will subsequently be infected with influenza. The mice providing donor cells for secondary responses come from this appendix (influenza primed mice) or appendix 3, 4, 5 or 7. In this manner, the secondary response of the donor antigen-specific T cells can be analyzed at similar time-points as described above for endogenous T cells.

In some experiments, we will employ immunotherapy through immunization of the mice. To enable these experiments, mice will be immunized with immunogens (antigens, TLR ligands, adjuvans etc) as described in detail in appendix 7 to study the protective effect against infection. It is also relevant to study the impact of therapeutic immunization (immunization after establishment of infection), as in many cases help can only be offered to diseased individuals. Therefore, mice will be challenged with the pathogen and subsequently be immunized with immunogens as described in detail in appendix 7.

We will use inbred mice on a common background, typically wildtype versus transgenic or knock out mice on a C57BL/6 background in the infection experiments. Alternatively, mixed bone marrow chimeric mice will be used that have a wildtype and / or a transgenic / knockout compartment. We will employ this strategy to ensure that the infection is similarly controlled in the wildtype and in the transgenic setting. Mixed bone marrow chimeric mice will be generated by 2x irradiation (typically 4 to 5 Gray) of recipient mice and adoptive transfer of donor bone marrow by intravenous injection. Mice will be used 2-3 months after bone marrow reconstitution. Injections with antibodies can be used to label immune populations (e.g circulating CD8 T cells with non-depleting anti-CD8 antibodies), to deplete immune or hematopoietic populations (e.g. CD8 T cells with depleting anti-CD8 antibodies), to rescue the survival of specific immune populations (e.g. ARTC2 nanobodies to rescue CD8 T cell subsets) or to block specific immune processes (e.g. anti-LFA1 antibodies to block adhesion/migration of immune cells). In addition, in some experiments, small molecule inhibitors will be used to block specific immune processes (e.g. FTY720 to block migration of immune cells). Some genetic models require the addition of doxycycline (eg tet on / tet off system), tamoxifen (eg the ERT2-CRE system), diphtheria toxin (eg DTR transgenic mice), poly IC (eg Mx1-CRE system) or other to be specified reagents to induce or suppress expression of the molecules of interest.

Small volumes of blood within the effective guidelines (no more than 300 ul blood per mouse per 14 days) will be drawn from the tail vein of the mice at various time points to study the kinetics of the immune response after infection. At the end of the experiment, the mice will be humanely euthanized to enable harvest of the organs (e.g. lymph nodes, spleen, bone marrow, liver, gut, kidneys and lungs) for study of the viral load and the immune response within these organs.

Primary outcome parameters:

The immune response will be monitored using flow cytometric analysis, which allows for the identification and the phenotyping of immune cell populations within different organs of experimental and control mice. The analysis of these immune cell populations will allow assessment of the degree of inflammation and determination of the size and type of innate and adaptive immune responses (e.g. the responses of monocytes, neutrophils, CD4 and CD8 T cells, and B cells). In addition to flow cytometry, histology will be used to assess inflammation and pathology within the indicated organs that are targeted by the influenza infection. Measurements of the viral loads within the organs and blood are performed to study the kinetics of viral clearance in transgenic or treated animals compared to controls. *In vitro* experiments will be performed with immune cells from the isolated tissues to assess the potential of the immune cells in restimulation experiments. In some experiments, antibody titers will be determined by ELISA.

For some experiments, we will employ intravital imaging to study *in vivo* T cell responses. For this purpose, infected animals will be anesthetized using isoflurane. The tissue of interest will be prepared and positioned to enable *in vivo* imaging. The animals will be kept on a heating pad during the imaging procedure for maintenance of body temperature. *In vivo* imaging will take no more than 4 hours per animal and after the procedure the animals are euthanized using CO₂ asphyxiation.

We expect that 50% of the mice will experience primary infection and that 50% will experience recall infections of which the majority (90%) will receive no more than one recall infection. We expect that 33.3% of the mice will not receive further treatment besides the infections, 33.3% will receive adoptive transfers of immune or hematopoietic cells and 33.3% will receive immunizations or other treatments as described above. From the majority of the mice (90%) blood will be taken prior to sacrifice. A minority of the mice will be analyzed by intravital imaging (less than 10%). All mice will be sacrificed at the end of the experiment.

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

Nature:

Mice with an inbred background (e.g. C57BL/6) will be inoculated with a sublethal dose of influenza (typically 2500 tissue-culture infectious dose (TCID₅₀) in naïve mice and 25000 TCID₅₀ in influenza immune mice). Influenza immune mice have been previously primed or contain adoptive transfer of memory T cells that are known to provide enhanced protection against infection. Upon depletion of current stocks of influenza, new stocks will be validated *in vivo* using

titration around the current dose. The virus will typically be inoculated in PBS in a volume of 50 microliters. The virus is applied through intranasal inhalation under isoflurane anesthesia. In some cases influenza is administered through a different route (via intraperitoneal or intravenous injection) for comparison to intranasal infection.

Frequency

Infection with influenza will occur once per mouse for the study of primary responses and twice or more for the study of recall responses. Mice can acquire neutralizing antibodies that achieve rapid sterile immunity after infection and therefore, re-challenge responses will typically occur with different influenza strains (e.g. HKx31 and A/PR8/34).

Mice will typically be bled once or twice only to establish the efficacy of infection (assessed by the size of the virus-specific T cell response). In some experiments, mice will be bled more frequently to follow kinetics of the response (no more than 300 ul per mouse per 14 days).

In some cases, mice will be weighed up to daily after infection to assess disease severity (when immunity is compromised due to genetic deficiency).

Duration

Inoculation of the mice with the influenza virus takes no more than 5 minutes. It is expected to cause only mild discomfort for less than one day due to the inoculation. After the onset of infection, the mice may experience moderate discomfort for a maximum period of 7 to 14 days after infection. During this period, mice may lose up to 20% of their starting body weight (primary HKx31 infection, secondary infection HKx31 and A/PR8/34). In some cases, it can be necessary to use A/PR8/34 in primary infection to study the infection-associated immunopathology that is much more apparent after infection with this strain than with other influenza strains. After primary infection with A/PR8/34, mice may lose up to 30% of their starting body weight and transiently show visible signs of discomfort (hunched posture, reduced activity and ruffled fur). Importantly, infections are sublethal and have been carefully titrated to be at the minimal doses that achieve a robust innate and adaptive immune response. It is also important to note that these signs of discomfort are transient and mice will completely recover within 14 days after infection. Mice will be in experiment for up to 90 days after infection unless in unusual cases the longevity of the memory T cells is studied. In case of re-challenge experiments, mice can be in experiment for 90 days after the last infection (e.g. 180 days for secondary infection).

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

In order to minimize the number of animals required to achieve scientifically reliable and reproducible data, the number of animals required for the experiments is calculated through power analysis. Normally distributed data will ultimately be tested by student's t test or ANOVA depending on the number of groups or variables that will be measured. Non-parametric tests will be applied in the absence of a normal distribution and power testing will take that into account.

To exemplify, an infection experiment will typically comprise two study arms (eg control group versus knockout group). To demonstrate a 50% improvement in terms of immune response size between two groups (test vs controls) with the overall variability (relative standard deviation) being around 30, we will need a group size of 5 evaluable animals per group (power > 0.8 with $\alpha = 0.05$, two sided). The infection model is very consistent, and therefore, we expect only minimal loss of mice due to the inability to achieve infection or due to other causes (less than 10%). Thus, to account for losses during experimentation we will use 6 mice per group in this experiment. Consequently, we will need a group size of 6 animals per study arm, thus $2 \times 6 = 12$ animals per study.

The above example may not be representative for all of the experiments under this appendix. The exact group sizes will for instance depend on the number of groups and the parameters that will be analyzed in any given experiment. Therefore, each experiment will require separate power analyses and approval of the institutional animal welfare body (IvD) to determine the relevant group sizes.

B. The animals

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

Species

We will use inbred mice, because the immune response in these mice is well characterized and the reagents to measure the immune cell populations are available. Usage of inbred strains also reduces genetic variability and thus minimizes the number of required animals. The proposed influenza infection models are well-established mouse models for acute infection with intracellular pathogens, with which we have extensive prior experience. The availability of inbred strains (to enhance reproducibility) and genetically modified strains makes this the best model system to study the immune response to local primary and secondary infection in vivo.

For the experimentation, the gender of the mice is in most cases not relevant, which allows for optimal use of female and male mice from available stock.

Origin

Animals will be obtained through in-house breeding for wildtype or transgenic or knockout mouse lines. When available, littermates will be used in experiments as controls. If required, wild-type inbred control mice will be purchased from a certified commercial supplier to serve as controls.

Estimated Numbers

We will require approximately 2880 mice for these infection models.

These numbers are calculated based upon the number of molecules assessed, the number of time points, the number of immune therapies including cell transfers and immunizations and the number of groups and the size of the group. In the five years of the project, we expect to study 10 molecules after infection. These targets are assessed at four time points after primary infection and at four time points after secondary infection. We expect to study the role of these molecules in 3 different settings (control, adoptive T cell transfer and after immunization). For each time point two groups are examined (group 1: 6 control mice, group 2: 6 experimental mice). This requires 10 molecules x 3 settings x 8 time points x 6 animals x 2 groups = 2880 animals.

Life Stages

Young adult mice of approximately 8-16 weeks old will be used, as these mice have fully developed immune populations for protection against infection in the experiments. In case bone marrow chimeric mice are used, mice will be 4-6 months old due to the time it takes to reconstitute the immune compartments.

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

Mice will be used in experiments to assess the immune response to influenza virus. The immune response to these pathogens is a temporal cascade of complex interactions between different cell types, receptors, signaling molecules, transcription factors etc. *In vitro* studies using human samples or cell lines cannot mimic these complex interactions and no *in vitro* system exists for the generation of immune responses. There is also no computer modeling (*in silico*) that can accurately reproduce and predict the complex immune response of a living animal. Extensive searches in DB-ALM and ZEBET databases were also not able to suggest possible alternatives to the proposed animal experiments. Therefore, these studies can only be carried out in live animals.

The availability of inbred strains (to enhance reproducibility) and genetically modified strains makes the proposed influenza model the best system to study local immune responses *in vivo*.

Reduction

Power analyses will be done for each animal procedure to determine the minimum sample size of each group. The power analysis will be reviewed by the institutional animal welfare body (IvD) in order to obtain statistically significant and biologically relevant readouts from the proposed experiments. We manage to minimize the number of mice for these experiments by using inbred and therefore genetically identical mouse strains. This allows for smaller sample sizes and thus usage of lower total amounts of animals. We have reduced these experiments to include only crucial time points during the immune response. In addition, we perform kinetic analyses of immune responses in blood without directly sacrificing the animals. As blood samples do not reflect immune cell populations within the organs, it is required that at selected time points subgroups of animals will be humanely killed to obtain the organs.

Refinement

Animals are housed together in stable social groups with nesting and cage accessories (e.g. cage furniture) for their comfort.

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

1) To minimize animal discomfort, all experiments will be performed with the minimal dose of influenza virus that reproducibly infects the animals and generates a robust immune response. Animals will be housed in stable social groups at all times to minimize distress, as mice are social animals. Animals exhibiting any of the humane endpoints mentioned in Section J will be euthanized to reduce suffering. Specifically, mice will be weighed once every 3 days in the first 2 weeks after infection and if weight loss exceeds 20% of starting weight at the day of infection, mice will be euthanized to prevent further suffering. In case of primary A/PR8/34 infection 30% weight loss of starting weight at the day of infection will be used as cutoff.

2) There are no risks for adverse effects on the environment, as the infected mice are contained in DM-II facilities and the material is analyzed in ML-II facilities.

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.

Mice will be inoculated with influenza virus under isoflurane anesthesia. During the course of infection no measures can be taken to relieve pain, as such measures will interfere with the immune response that

we intend to study.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The majority of the mice (90%) will receive primary infection with strains other than A/PR8/34. These mice will demonstrate moderate discomfort during infection, including weight loss, reduced activity, ruffled fur and hunched posture. For some experiments (10%) primary A/PR8/34 infection is required, which will induce severe discomfort, which is reflected in more severe weight loss of up to 30% of starting weight. The loss of bodyweight is due to the infection of target tissues (lungs) and / or the resultant immune response directed at the pathogen that may cause collateral tissue damage. These effects transiently induce loss of appetite and consequently loss of bodyweight in the infected mice. As A/PR8/34 induces higher levels of immunopathology, the observed weight loss in these mice is more severe than for other influenza strains (up to 30% instead of up to 20% of starting body weight). It is important to note that the discomfort is transient (similar for all influenza strains including A/PR8/34). The infected mice do not demonstrate any symptoms of disease after day 14 post infection, since mice typically clear the infection within this timeframe. The observed weight loss is also transient and mice regain weight after the peak of infection at around day 10 after infection and are back at starting weight after about 14 days post-infection. In the proposed study, we include experimental time points of up to 90 days post infection, which means that mice can be without discomfort during a large part of the experiment. It is known that occasionally some mice will demonstrate disease symptoms more severely than expected or that disease symptoms persist due to inability to resolve infection. If symptoms are more severe or if they persist (that is mice do not recover within 14 days), these mice will be sacrificed as also described below under humane endpoints.

In case bone marrow chimeric mice are used in the experiments discomfort due to irradiation may arise (irradiation sickness). The irradiation is required to eliminate the host compartment of the immune system to make space for the donor bone marrow. The effects are transient (less than 2 weeks) as reconstitution with donor bone marrow results in full recovery of the irradiated mice. In rare cases when reconstitution is insufficient, irradiated mice will be eliminated on similar criteria as after infection as described under humane endpoints.

Explain why these effects may emerge.

These effects are a result of the infection and the accompanying inflammation that may cause moderate discomfort in the animals

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

The administration of analgesia is impossible, because of its potential inhibition of the immune response, which we intend to study in this project. To minimize severity of infection, we will use the viral inoculum in the lowest possible dose that induces a robust and reproducible immune response in the mice without causing excessive discomfort.

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.

Removal from this study will be based on critical clinical criteria including: 1) abnormal weight loss of greater than 20% of initial weight (or 30% of initial weight in case of primary A/PR8/34 infection), 2) severe breathing problems, 3) absence of recovery of observed weight loss at day 14 after infection and 4) any other serious symptoms of disease. In the case of sporadic or unpredicted problems, mice will be separated into different subgroups when possible (e.g. fighting), or killed humanely, if the health of the animal is impaired beyond the expected infectious symptoms.

Indicate the likely incidence.

We expect the occurrence of such complications and subsequent removal based on the critical clinical parameters as rare (approximately 5% of experimental mice).

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 level of discomfort associated with influenza infection except for primary A/PR8/34 infection is moderate. Primary A/PR8/34 infection can induce severe discomfort related to enhanced immune pathology. In this appendix, 90% of the infected mice will experience moderate discomfort related to influenza infection other than primary A/PR8/34 infection and 10% will experience severe discomfort related to A/PR8/34 infection.

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.

The animals need to be euthanized at the end of the experiment in order to harvest vital organs at key time points post infection. This is necessary in order to measure and assess immune responses in target organs of the infection and in the lymphoid organs.

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.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'.	30100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 03	Type of animal procedure Systemic infection with <i>Listeria monocytogenes</i> or LCMV

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.

General design of animal procedures:

In order to study the immune response to systemic infection, the widely used acute infection models of *Listeria monocytogenes* (*L.m.*) and the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) will be employed. Mice will be inoculated with *L.m.* via intravenous, intraperitoneal, oral or intragastric routes to establish *L.m.* infection, and / or with LCMV via intravenous or intraperitoneal routes to establish LCMV infection. In some experiments other routes of infection may be employed (e.g. intranasal infection).

We will infect naïve mice to study primary immune responses. We are interested in early timepoints (up to day 7 p.i.) to study innate responses, in the peak of the primary adaptive response at day 8-10 p.i. to study the formation of adaptive responses, in the contraction of the adaptive response (day 11 to 14 p.i.), and in the memory phase of the adaptive response after clearance of the infection (after day 14 p.i.).

We will infect immune mice to study recall responses. Mice will be re-challenged with a second homologous infection (2x *L.m.* or 2x LCMV) or a second heterologous infection. For heterologous recall responses, first mice will be infected with LCMV or *L.m.* and then after at least 30 days the same mice will be infected with a different pathogen containing the same epitope as LCMV or *L.m.* (e.g. LCMV → *L.m.* containing the gp33 epitope of LCMV). The heterologous settings will ensure that memory T cells formed in the first response can respond to the re-challenge in the absence of neutralizing antibodies that can immediately clear secondary infection. After the sequential infections, the recall immune response will be followed at similar time-points as displayed above for the primary immune response.

We will also employ an alternative approach to study primary and secondary responses using adoptive transfer of T cells. To study primary responses, naïve T cells of wildtype or TCR transgenic mice (e.g. OT-I or P14 mice), in some cases carrying additional genetically modified alleles, will be isolated and transferred using intravenous injection into

recipient mice that will subsequently be infected with LCMV or *L.m.* The mice providing donor cells for primary responses come from appendix 6. In this manner, the primary response of the donor antigen-specific T cells can be analyzed at similar time-points as described above for endogenous T cells. To study secondary responses, memory or *in vitro* activated T cells of wildtype or TCR transgenic mice will be isolated and transferred using intravenous injection into recipient mice that will subsequently be infected with LCMV or *L.m.* The mice providing donor cells for secondary responses come from this appendix (LCMV or *L.m.* primed mice) or appendix 2, 4, 5 or 7. In this manner, the secondary response of the donor antigen-specific T cells can be analyzed at similar time-points as described above for endogenous T cells.

In some experiments, we will employ immunotherapy through immunization of the mice. To enable these experiments, mice will be immunized with immunogens (antigens, TLR ligands, adjuvans etc) as described in detail in appendix 7 to study the protective effect against infection. It is also relevant to study the impact of therapeutic immunization (immunization after establishment of infection), as in many cases help can only be offered to diseased individuals. Therefore, mice will be challenged with the pathogen and subsequently be immunized with immunogens as described in detail in appendix 7.

We will use inbred mice on a common background, typically wildtype versus transgenic or knock out mice on a C57BL/6 background in the infection experiments. Alternatively, mixed bone marrow chimeric mice will be used that have a wildtype and / or a transgenic / knockout compartment. We will employ this strategy to ensure that the infection is similarly controlled in the wildtype and in the transgenic setting. Mixed bone marrow chimeric mice will be generated by 2x irradiation (typically 4 to 5 Gray) of recipient mice and adoptive transfer of donor bone marrow by intravenous injection. Mice will be used 2-3 months after bone marrow reconstitution. Injections with antibodies can be used to label immune populations (e.g circulating CD8 T cells with non-depleting anti-CD8 antibodies), to deplete immune or hematopoietic populations (e.g. CD8 T cells with depleting anti-CD8 antibodies), to rescue the survival of specific immune populations (e.g. ARTC2 nanobodies to rescue CD8 T cell subsets) or to block specific immune processes (e.g. anti-LFA1 antibodies to block adhesion/migration of immune cells). In addition, in some experiments, small molecule inhibitors will be used to block specific immune processes (e.g. FTY720 to block migration of immune cells). Some genetic models require the addition of doxycycline (eg tet on / tet off system), tamoxifen (eg the ERT2-CRE system), diphtheria toxin (eg DTR transgenic mice), poly IC (eg Mx1-CRE system) or other to be specified reagents to induce or suppress expression of the molecules of interest.

Small volumes of blood within the effective guidelines (no more than 300 ul blood per mouse per 14 days) will be drawn from the tail vein of the mice at various time points to study the kinetics of the immune response after infection. At the end of the experiment, the mice will be humanely euthanized to enable harvest of the organs (e.g. lymph nodes, spleen, bone marrow, liver, gut, kidneys and lungs) for study of the viral or bacterial load and the immune response within these organs.

Primary outcome parameters:

The immune response will be monitored using flow cytometric analysis, which allows for the identification and the phenotyping of immune cell populations within different organs of experimental and control mice. The analysis of these immune cell populations will allow assessment of the degree of inflammation and determination of the size and type of innate and adaptive immune responses (e.g. the responses of monocytes, neutrophils, CD4 and CD8 T cells, and B cells). In addition to flow cytometry, histology will be used to assess inflammation and pathology within the indicated organs that are targeted by the *L.m.* or LCMV infection. Measurements of the bacterial or viral loads within the organs and blood are performed to study the kinetics of bacterial or viral clearance in transgenic / knockout or treated animals compared to controls. *In vitro* experiments will be performed with immune cells from the isolated tissues to assess the potential of the immune cells in restimulation experiments. ELISAs will be performed to determine antibody titers.

For some experiments, we will employ intravital imaging to study *in vivo* T cell responses. For this purpose, infected animals will be anesthetized using isoflurane. The tissue of interest will be prepared and positioned to enable *in vivo* imaging. The animals will be kept on a heating pad during the imaging procedure for maintenance of body temperature. *In vivo* imaging will take no more than 4 hours per animal and after the procedure the animals are euthanized using CO₂ asphyxiation.

We expect that 50% of the mice will experience primary infection and that 50% will experience recall infections of which the majority (90%) will receive no more than one recall infection. We expect that 33.3% of the mice will not receive further treatment besides the infections, 33.3% will receive adoptive transfers of immune or hematopoietic cells and 33.3% will receive immunizations or other treatments as described above. From the majority of the mice (90%) blood will be taken prior to sacrifice. A minority of the mice will be analyzed by intravital imaging (less than 10%). All mice will be sacrificed at the end of the experiment.

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

Nature:

L.m. infection:

Mice with an inbred background (e.g. C57BL/6) will be inoculated with a sublethal dose of *L.m.* (typically 25,000 colony forming units (CFU) in naïve mice and approximately 250,000 CFU in *L.m.* immune mice). *L.m.* immune mice have been primed or contain adoptive transfer of memory T cells that are known to provide enhanced protection against infection. Upon depletion of current stocks of *L.m.* bacteria, new stocks will be generated and new stocks will be validated *in vivo* using titration around the current dose. The bacteria will typically be inoculated in PBS in a volume of 200 microliters. *L.m.* bacteria are applied intravenously through injection in the tail vein, through intraperitoneal injection, or through intragastric injection or by oral administration. Intravenous and intraperitoneal injection procedures result in systemic infection, whereas intragastric injection and oral administration target infection preferentially to the small intestine. In some cases different routes of inoculation are applied.

LCMV infection:

Mice with an inbred background (e.g. C57BL/6) will be inoculated with a sublethal dose of LCMV Armstrong (typically 1×10^5 plaque forming units (PFU) in naïve mice and approximately 1×10^6 PFU in LCMV immune mice). LCMV immune mice have been primed or contain adoptive transfer of memory T cells that are known to provide enhanced protection against infection. Upon depletion of current stocks of LCMV virus, new stocks will be validated *in vivo* using titration around the current dose. The virus will be inoculated in PBS in a volume of 200 microliters. LCMV virus is applied intravenously through injection in the tail vein or through intraperitoneal injection. Intravenous and intraperitoneal injection procedures both result in systemic infection. In some cases different routes of inoculation are applied.

Frequency

Infection with *L.m.* or LCMV will occur once per mouse for the study of primary responses and twice or more for the study of recall responses. Mice can acquire neutralizing antibodies that achieve rapid sterile immunity after infection and therefore re-challenge will typically occur by sequential infection with different pathogens (e.g. first *L.m.* and then LCMV, or alternatively, first LCMV and then *L.m.*).

Mice will typically be bled once or twice only to establish the efficacy of infection (assessed by the size of the pathogen-specific T cell response). In some experiments, mice will be bled more frequently to follow kinetics of the response (no more than 300 μ l per mouse per 14 days).

In some cases, mice will be weighed up to daily after infection to assess disease severity (when immunity is compromised due to genetic deficiency).

Duration

Inoculation of the mice with the LCMV virus or the *L.m.* bacteria takes no more than 5 minutes. It is expected to cause only mild discomfort for less than one day due to the injection. After the onset of infection, the mice may experience moderate discomfort for a maximum period of 7 to 14 days after infection. During this period, mice are typically asymptomatic, but can show visible signs of discomfort such as weight loss of up to 20% of starting weight, ruffled fur, reduced activity and hunched posture. Importantly, infections are sublethal and have been carefully titrated to be at the minimal doses that achieve a robust innate and adaptive immune response. It is also important to note that these signs of discomfort are transient and mice will completely recover within 14 days after infection. Mice will be in experiment for up to 90 days after infection unless in unusual cases the longevity of the memory T cells is studied. In case of re-challenge experiments, mice can be in experiment for 90 days after the last infection (e.g. 180 days for secondary infection).

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

In order to minimize the number of animals required to achieve scientifically reliable and reproducible data, the number of animals required for the experiments is calculated through power analysis. Normally distributed data will ultimately be tested by student's t test or ANOVA depending on the number of groups or variables that will be measured. Non-parametric tests will be applied in the absence of a normal distribution and power testing will take that into account.

To exemplify, an infection experiment will typically comprise two study arms (eg control group versus knockout group). To demonstrate a 50% improvement in terms of immune response size between two groups (test vs controls) with the overall variability (relative standard deviation) being around 30, we will need a group size of 5 evaluable animals per group (power > 0.8 with $\alpha = 0.05$, two sided). The infection model is very consistent, and therefore, we expect only minimal loss of mice due to the inability to achieve infection or due to other causes (less than 10%). Thus, to account for losses during experimentation we will use 6 mice per group in this experiment. Consequently, we will need a group size of 6 animals per study arm, thus $2 \times 6 = 12$ animals per study.

The above example may not be representative for all of the experiments under this appendix. The exact group sizes will for instance depend on the number of groups and the parameters that will be analyzed in any given experiment. Therefore, each experiment will require separate power analyses and approval of the institutional animal welfare body (IvD) to determine the relevant group sizes.

B. The animals

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

Species

We will use inbred mice, because the immune response in these mice is well characterized and the reagents to measure the immune cell populations are available. Usage of inbred strains also reduces genetic variability and thus minimizes the number of required animals. The proposed *L.m.* and LCMV infection models are well-established mouse models for acute infection with intracellular pathogens, with which we have extensive prior experience. The availability of inbred strains (to enhance reproducibility) and genetically modified strains makes these models the best systems to study the immune response to systemic primary and secondary infections in vivo.

For the experimentation, the gender of the mice is in most cases not relevant, which allows for optimal use of female and male mice from available stock.

Origin

Animals will be obtained through in-house breeding for wild-type or transgenic or knockout mouse lines. When available, littermates will be used in experiments as controls. If required, wild-type inbred control mice will be purchased from a certified commercial supplier to serve as controls.

Estimated Numbers

We will require approximately 5760 mice for these infection models.

These numbers are calculated based upon the number of molecules assessed, the number of time points, the number of immune therapies including cell transfers and immunizations and the number of groups and the size of the group. In the five years of the project, we expect to study 10 molecules after infection. These targets are assessed at four time points after primary infection and at four time points after secondary infection. We expect to study the role of these molecules in 3 different settings (control, adoptive T cell transfer and after immunization). For each time point two groups are examined (group 1: 6 control mice, group 2: 6 experimental mice). This requires 10 molecules x 3 settings x 8 time points x 6 animals x 2 groups x 2 types of infection models (*Listeria* and LCMV) = 5760 animals.

Life Stages

Young adult mice of approximately 8-16 weeks old will be used, as these mice have fully developed immune populations for protection against infection in the experiments. In case bone marrow chimeric mice are used, mice will be 4-6 months old due to the time it takes to reconstitute the immune compartments.

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

Mice will be used in experiments to assess the immune response to LCMV virus or *L.m.* bacteria. The immune response to these pathogens is a temporal cascade of complex interactions between different cell types, receptors, signaling molecules, transcription factors etc. *In vitro* studies using human samples or cell lines cannot mimic these complex interactions and no *in vitro* system exists for the generation of immune responses. There is also no computer modeling (*in silico*) that can accurately reproduce and predict the complex immune response of a living animal. Extensive searches in DB-ALM and ZEBET databases were also not able to suggest possible alternatives to the proposed animal

experiments. Therefore, these studies can only be carried out in live animals. The availability of inbred strains (to enhance reproducibility) and genetically modified strains makes these infection models the best systems to study systemic immune responses in vivo.

Reduction

Power analyses will be done for each animal procedure to determine the minimum sample size of each group. The power analysis will be reviewed by the institutional animal welfare body (IvD) in order to obtain statistically significant and biologically relevant readouts from the proposed experiments. We manage to minimize the number of mice for these experiments by using inbred and therefore genetically identical mouse strains. This allows for smaller sample sizes and thus usage of lower total amounts of animals. We have reduced these experiments to include only crucial time points during the immune response. In addition, we perform kinetic analyses of immune responses in blood without directly sacrificing the animals. As blood samples do not reflect immune cell populations within the organs, it is required that at selected time points subgroups of animals will be humanely killed to obtain the organs.

Refinement

Animals are housed together in stable social groups with nesting and cage accessories (e.g. cage furniture) for their comfort.

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

1) To minimize animal discomfort, all experiments will be performed with the minimal dose of LCMV virus or *L.m.* bacteria that reproducibly infects the animals and generates a robust immune response. Animals will be housed in stable social groups at all times to minimize distress, as mice are social animals. Animals exhibiting any of the humane endpoints mentioned in Section J will be euthanized to reduce suffering.

2) There are no risks for adverse effects on the environment, as the infected mice are contained in DM-II facilities and the material is analyzed in ML-II facilities.

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.

During the course of infection no measures can be taken to relieve pain, as such measures will interfere with the immune response that we intend to study.

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?

Mice inoculated with a sublethal dose of LCMV virus or *L.m.* bacteria can demonstrate moderate discomfort during infection, including weight loss, reduced activity, ruffled fur and hunched posture. The loss of bodyweight is due to the infection of target tissues (multiple tissues including liver, gut and kidneys) and / or the resultant immune response directed at the pathogen that may cause collateral tissue damage. These effects may transiently induce loss of appetite and consequently loss of bodyweight in the infected mice. It is important to note that the discomfort is transient. The infected mice do not demonstrate any symptoms of disease after day 14 post infection, since mice typically clear the infection within this timeframe. The observed weight loss is also transient and mice regain weight after the peak of infection at around day 8 after infection and are back at starting weight after about 14 days post-infection. In the proposed study, we include experimental time points of up to 90 days post infection, which means that mice can be without discomfort during a large part of the experiment. It is known that occasionally some mice will demonstrate disease symptoms more severely than expected or that disease symptoms persist due to inability to resolve infection. If symptoms are more severe or if they persist (that is mice do not recover within 14 days), these mice will be sacrificed as also described below under humane endpoints.

In case bone marrow chimeric mice are used in the experiments discomfort due to irradiation may arise (irradiation sickness). The irradiation is required to eliminate the host compartment of the immune system to make space for the donor bone marrow. The effects are transient (less than 2 weeks) as reconstitution with donor bone marrow results in full recovery of the irradiated mice. In rare cases when reconstitution is insufficient, irradiated mice will be eliminated on similar criteria as after infection as described under humane endpoints.

Explain why these effects may emerge.

These effects are a result of the infection and the accompanying inflammation that may cause moderate discomfort in the animals

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

The administration of analgesia is impossible, because of its potential inhibition of the immune response, which we intend to study in this project. To minimize severity of infection, we will use the bacterial inoculum in the lowest possible dose that induces a robust, reproducible immune response in the mice without causing excessive discomfort.

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.

Removal from this study will be based on critical clinical criteria including: 1) weight loss indicative of more than 20% of the initial weight, 2) severe breathing problems, 3) absence of recovery of observed weight loss at day 14 after infection and 4) any other serious symptoms of disease. In the case of sporadic or unpredicted problems, mice will be separated into different subgroups when possible (e.g. fighting), or killed humanely, if the health of the animal is impaired beyond the expected infectious symptoms.

Indicate the likely incidence.

We expect the occurrence of such complications and subsequent removal based on the critical clinical parameters as rare (approximately 5% of experimental mice).

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 level of discomfort associated with infection is moderate. In this appendix, it is expected that 100% of the infected mice will experience moderate discomfort.

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.

The animals need to be euthanized at the end of the experiment in order to harvest vital organs at key time points post infection. This is necessary in order to measure and assess immune responses in target organs of the infection and in the lymphoid organs.

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.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'.	30100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 04	Type of animal procedure Infection with acute and chronic LCMV

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.

General design of animal procedures:

In order to study the immune response to acute versus chronic infection, the widely used infection models of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) will be employed. Different strains of LCMV induce acute infection (LCMV WE and LCMV Armstrong) or chronic infection (LCMV Clone 13 and LCMV Docile). Therefore, it is possible to directly compare T cell responses of the same specificity in acute and chronic immune responses. Mice will be inoculated with LCMV via intravenous or intraperitoneal routes to establish infection. In some experiments other routes of infection may be employed (e.g. intranasal infection).

We will infect naïve mice to study acute and chronic immune responses against LCMV. We are interested in early timepoints (up to day 7 p.i.) to study innate responses, in the peak of the primary adaptive response at day 8 p.i. to study the formation of adaptive responses, in the contraction of the adaptive response (day 9 to 14 p.i.), and in the memory phase of the adaptive response after clearance of acute infection (after day 14 p.i.) or in the chronic phase of the adaptive response at late timepoints (after day 14 p.i.).

We will also employ an alternative approach to study acute and chronic immune responses using adoptive transfer of T cells. For this purpose, T cells of wildtype or TCR transgenic mice (e.g. P14 mice), in some cases carrying additional genetically modified alleles, will be isolated and transferred using intravenous injection into recipient mice that will subsequently be infected with acute or chronic strains of LCMV. The mice providing donor cells for these responses come from this appendix (LCMV primed mice) or appendix 2, 3, 4, 5, 6 or 7. In this manner, the acute or chronic immune response of the donor antigen-specific T cells can be analyzed at similar time-points as described above for endogenous T cells.

In some experiments, we will employ immunotherapy through immunization of the mice. To enable these experiments, mice will be immunized with immunogens (antigens, TLR ligands, adjuvans etc) as described in detail in appendix 7 to

study the protective effect against infection. It is also relevant to study the impact of therapeutic immunization (immunization after establishment of infection), as in many cases help can only be offered to diseased individuals. Therefore, mice will be challenged with the pathogen and subsequently be immunized with immunogens as described in detail in appendix 7.

We will use inbred mice on a common background, typically wildtype versus transgenic or knock out mice on a C57BL/6 background in the infection experiments. Alternatively, mixed bone marrow chimeric mice will be used that have a wildtype and / or a transgenic / knockout compartment. We will employ this strategy to ensure that the infection is similarly controlled in the wildtype and in the transgenic setting. Mixed bone marrow chimeric mice will be generated by 2x irradiation (typically 4 to 5 Gray) of recipient mice and adoptive transfer of donor bone marrow by intravenous injection. Mice will be used 2-3 months after bone marrow reconstitution. Injections with antibodies can be used to label immune populations (e.g circulating CD8 T cells with non-depleting anti-CD8 antibodies), to deplete immune or hematopoietic populations (e.g. CD8 T cells with depleting anti-CD8 antibodies), to rescue the survival of specific immune populations (e.g. ARTC2 nanobodies to rescue CD8 T cell subsets) or to block specific immune processes (e.g. anti-LFA1 antibodies to block adhesion/migration of immune cells). In addition, in some experiments, small molecule inhibitors will be used to block specific immune processes (e.g. FTY720 to block migration of immune cells). Some genetic models require the addition of doxycycline (eg tet on / tet off system), tamoxifen (eg the ERT2-CRE system), diphtheria toxin (eg DTR transgenic mice), poly IC (eg Mx1-CRE system) or other to be specified reagents to induce or suppress expression of the molecules of interest.

Small volumes of blood within the effective guidelines (no more than 300 ul blood per mouse per 14 days) will be drawn from the tail vein of the mice at various time points to study the kinetics of the immune response after infection. At the end of the experiment, the mice will be humanely euthanized to enable harvest of the organs (e.g. lymph nodes, spleen, bone marrow, liver, gut, kidneys and lungs) for study of the viral load and the immune response within these organs.

Primary outcome parameters:

The immune response will be monitored using flow cytometric analysis, which allows for the identification and the phenotyping of immune cell populations within different organs of experimental and control mice. The analysis of these immune cell populations will allow assessment of the degree of inflammation and determination of the size and type of innate and adaptive immune responses (e.g. the responses of monocytes, neutrophils, CD4 and CD8 T cells, and B cells). In addition to flow cytometry, histology will be used to assess inflammation and pathology within the indicated organs that are targeted by LCMV infection. Measurements of the viral loads within the organs and blood are performed to study the kinetics of viral clearance in transgenic / knockout or treated animals compared to controls. *In vitro* experiments will be performed with immune cells from the isolated tissues to assess the potential of the immune cells in restimulation experiments. In some experiments, antibody titers will be determined by ELISA.

For some experiments, we will employ intravital imaging to study in vivo T cell responses. For this purpose, infected animals will be anesthetized using isoflurane. The tissue of interest will be prepared and positioned to enable in vivo imaging. The animals will be kept on a heating pad during the imaging procedure for maintenance of body temperature. In vivo imaging will take no more than 4 hours per animal and after the procedure the animals are euthanized using CO2 asphyxiation.

We expect that 50% of the mice will experience acute primary infection and that 50% will experience chronic primary infection. We expect that 33.3% of the mice will not receive further treatment besides the infections, 33.3% will receive adoptive transfers of immune or hematopoietic cells and 33.3% will receive immunizations or other treatments as described above. From the majority of the mice (90%) blood will be taken prior to sacrifice. A minority of the mice will be analyzed by intravital imaging (less than 10%). All mice will be sacrificed at the end of the experiment.

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

Nature:

To induce acute immune responses, mice with an inbred background (e.g. C57BL/6) will be inoculated with a sublethal dose of LCMV Armstrong (typically 1×10^5 plaque forming units (PFU)). To induce chronic immune responses, mice will be inoculated with a sublethal dose of LCMV Clone 13 (typically 1×10^6 PFU). Upon depletion of current stocks of LCMV virus, new stocks will be validated *in vivo* using titration around the current dose. The virus will be inoculated in PBS in a volume of 200 microliters. LCMV virus is applied intravenously through injection in the tail vein or through intraperitoneal injection. Both injection procedures result in systemic infection.

Frequency

Infection with LCMV will only occur once per mouse.

Mice will typically be bled once or twice only to establish the efficacy of infection (assessed by the size of the pathogen-specific T cell response). In some experiments, mice will be bled more frequently to follow kinetics of the response (no more than 300 ul per mouse per 14 days).

In some cases, mice will be weighed up to daily after infection to assess disease severity (when immunity is compromised due to genetic deficiency).

Duration

Inoculation of the mice with the LCMV virus takes no more than 5 minutes. It is expected to cause only mild discomfort for less than one day due to the injection. After the onset of acute or chronic infection, the mice may experience moderate discomfort for a maximum period of 7 to 14 days after infection. During this period, mice are typically asymptomatic, but can show visible signs of discomfort such as weight loss of up to 20% of starting weight, ruffled fur, reduced activity and hunched posture. Mice experiencing acute infection completely clear infection within 14 days and are asymptomatic thereafter. Mice experiencing chronic infection do not clear the virus within the first 2 months after inoculation, but the viral loads are strongly reduced after 14 days, which results in asymptomatic disease during this stage. Importantly, infections are sublethal and have been carefully titrated to be at the minimal doses that achieve a robust innate and adaptive immune response. Mice will be in experiment for up to 90 days after infection unless in unusual cases the longevity of the memory T cells is studied.

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

In order to minimize the number of animals required to achieve scientifically reliable and reproducible data, the number of animals required for the experiments is calculated through power analysis. Normally distributed data will ultimately be tested by student's t test or ANOVA depending on the number of groups or variables that will be measured. Non-parametric tests will be applied in the absence of a normal distribution and power testing will take that into account.

To exemplify, an infection experiment will typically comprise two study arms (eg control group versus knockout group). To demonstrate a 50% improvement in terms of immune response size between two groups (test vs controls) with the overall variability (relative standard deviation) being around 30, we will need a group size of 5 evaluable animals per group (power > 0.8 with $\alpha = 0.05$, two sided). The infection model is very consistent, and therefore, we expect only minimal loss of mice due to the inability to achieve infection or due to other causes (less than 10%). Thus, to account for losses during experimentation we will use 6 mice per group in this experiment. Consequently, we will need a group size of 6 animals per study arm, thus $2 \times 6 = 12$ animals per study.

The above example may not be representative for all of the experiments under this appendix. The exact group sizes will for instance depend on the number of groups and the parameters that will be analyzed in any given experiment. Therefore, each experiment will require separate power analyses and approval of the institutional animal welfare body (IvD) to determine the relevant group sizes.

B. The animals

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

Species

We will use inbred mice, because the immune response in these mice is well characterized and the reagents to measure the immune cell populations are available. Usage of inbred strains also reduces genetic variability and thus minimizes the number of required animals. The proposed LCMV infection models are well-established mouse models for **acute and chronic** infection with intracellular pathogens, with which we have extensive prior experience. The availability of inbred strains (to enhance reproducibility) and genetically modified strains makes this the best model system to study the immune response to acute versus chronic infection in vivo.

For the experimentation, the gender of the mice is in most cases not relevant, which allows for optimal use of female and male mice from available stock.

Origin

Animals will be obtained through in-house breeding for wild-type or transgenic or knockout mouse lines. When available, littermates will be used in experiments as controls. If required, wild-type inbred control mice will be purchased from a certified commercial supplier to serve as controls.

Estimated Numbers

We will require approximately 2880 mice for these infection models.

These numbers are calculated based upon the number of molecules assessed, the number of time points, the number of immune therapies including cell transfers and immunizations and the number of groups and the size of the group. In the five years of the project, we expect to study 10 molecules after infection. These targets are assessed at four time points after acute infection and at four time points after chronic infection. We expect to study the role of these molecules in 3

different settings (control, adoptive T cell transfer and after immunization). For each time point two groups are examined (group 1: 6 control mice, group 2: 6 experimental mice). This requires 10 molecules x 3 settings x 8 time points x 6 animals x 2 groups = 2880 animals.

Life Stages

For acute LCMV infection (LCMV Armstrong), young adult mice of approximately 8-16 weeks old will be used (50% of the mice), as these mice have fully developed immune populations for protection against infection in the experiments. For chronic LCMV infection (LCMV Armstrong Clone 13), mice will be used of 4-6 weeks of age (50% of the mice), as incomplete development of the immune system is required to establish chronic infection. In case bone marrow chimeric mice are used, mice will be 4-6 months old due to the time it takes to reconstitute the immune compartments.

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

Mice will be used in experiments to assess the immune response to LCMV virus. The immune response to these pathogens is a temporal cascade of complex interactions between different cell types, receptors, signaling molecules, transcription factors etc. *In vitro* studies using human samples or cell lines cannot mimic these complex interactions and no *in vitro* system exists for the generation of immune responses. There is also no computer modeling (*in silico*) that can accurately reproduce and predict the complex immune response of a living animal. Extensive searches in DB-ALM and ZEBET databases were also not able to suggest possible alternatives to the proposed animal experiments. Therefore, these studies can only be carried out in live animals. The availability of inbred strains (to enhance reproducibility) and genetically modified strains makes this the best model system to study the immune response to systemic chronic infection *in vivo*.

Reduction

Power analyses will be done for each animal procedure to determine the minimum sample size of each group. The power analysis will be reviewed by the institutional animal welfare body (IvD) in order to obtain statistically significant and biologically relevant readouts from the proposed experiments. We manage to minimize the number of mice for these experiments by using inbred and therefore genetically identical mouse strains. This allows for smaller sample sizes and thus usage of lower total amounts of animals. We have reduced these experiments to include only crucial time points during the immune response. In addition, we perform kinetic analyses of immune responses in blood without directly sacrificing the animals. As blood samples do not reflect immune cell populations within the organs, it is required that at selected time points subgroups of animals will be humanely killed to obtain the organs.

Refinement

Animals are housed together in stable social groups with nesting and cage accessories (e.g. cage furniture) for their comfort.

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

1) To minimize animal discomfort, all experiments will be performed with the minimal dose of LCMV virus that reproducibly infects the animals and generates a robust immune response. Animals will be housed in stable social groups at all times to minimize distress, as mice are social animals. Animals exhibiting any of the humane endpoints mentioned in Section J will be euthanized to reduce suffering. Specifically, mice will be weighed once every 3 days in the first 2 weeks after infection and if weight loss exceeds 20% of starting weight at the day of infection, mice will be euthanized to prevent further suffering.

2) There are no risks for adverse effects on the environment, as the infected mice are contained in DM-II facilities and

the material is analyzed in ML-II facilities.

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.

During the course of infection no measures can be taken to relieve pain, as such measures will interfere with the immune response that we intend to study.

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?

Mice inoculated with a sublethal dose of LCMV virus can demonstrate moderate discomfort during infection, including weight loss, reduced activity, ruffled fur and hunched posture. The loss of bodyweight is due to the infection of target tissues (multiple tissues including liver, gut and kidneys) and / or the resultant immune response directed at the pathogen that may cause collateral tissue damage. These effects may transiently induce loss of appetite and consequently loss of bodyweight in the infected mice. It is important to note that the discomfort is transient. The infected mice do not demonstrate any symptoms of disease after day 14 post infection, since mice typically clear the infection within this timeframe (acute infection) or are able to reduce the viral titers substantially, although not completely (chronic infection). The observed weight loss is also transient and mice regain weight after the peak of infection at around day 8

after infection and are back at starting weight after about 14 days post-infection. In the proposed study, we include experimental time points of up to 90 days post infection, which means that mice can be without discomfort during a large part of the experiment. It is known that occasionally some mice will demonstrate disease symptoms more severely than expected or that disease symptoms persist due to inability to resolve infection. If symptoms are more severe or if they persist (that is mice do not recover within 14 days), these mice will be sacrificed as also described below under humane endpoints.

In case bone marrow chimeric mice are used in the experiments discomfort due to irradiation may arise (irradiation sickness). The irradiation is required to eliminate the host compartment of the immune system to make space for the donor bone marrow. The effects are transient (less than 2 weeks) as reconstitution with donor bone marrow results in full recovery of the irradiated mice. In rare cases when reconstitution is insufficient, irradiated mice will be eliminated on similar criteria as after infection as described under humane endpoints.

Explain why these effects may emerge.

These effects are a result of the infection and the accompanying inflammation that may cause moderate discomfort in the animals

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

The administration of analgesia is impossible, because of its potential inhibition of the immune response, which we intend to study in this project. To minimize severity of infection, we will use the virus in the lowest dose that induces a robust, reproducible immune response in the mice without causing excessive discomfort.

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.

Removal from this study will be based on critical clinical criteria including: 1) abnormal weight loss of greater than 20% of initial weight, 2) severe breathing problems, 3) absence of recovery of observed weight loss at day 14 after infection and 4) any other serious symptoms of disease. In the case of sporadic or unpredicted problems, mice will be separated into different subgroups when possible (e.g. fighting), or killed humanely, if the health of the animal is impaired beyond the expected infectious symptoms.

Indicate the likely incidence.

We expect the occurrence of such complications and subsequent removal based on the critical clinical parameters as rare (approximately 5% of experimental mice).

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 level of discomfort associated with infection is moderate. In this appendix, we expect that 100% of the infected mice will experience moderate discomfort.

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.

The animals need to be euthanized at the end of the experiment in order to harvest vital organs at key time points post infection. This is necessary in order to measure and assess immune responses in target organs of the infection and in the lymphoid organs.

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.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'.	30100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 05	Type of animal procedure Tumor challenge

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.

General design of animal procedures:

This appendix describes the use of transplantable tumor models in mice as a surrogate for cancer patients to study the efficacy of adoptive T cell transfer as an anti-cancer therapy. Mice will be injected/implanted with a tumor cell line (e.g. the melanoma cell line B16 or the colon carcinoma cell line MC38) at an ectopic site (usually subcutaneously in the right and / or left flank) or an orthotopic site (e.g. breast cancer cell lines in the fat pads) as a surrogate for primary tumor formation or systemically to mimic metastasis formation. The tumor cell lines cover a wide range in immunogenicity (e.g. MC38 is immunogenic, whereas B16 is not immunogenic). Transplantable tumor models do not completely reflect the formation of endogenous tumors. Despite these translation inconsistencies, the original findings on the efficacy of anti-PD1 therapy have been documented using transplantable tumor models. As these findings translated well into more advanced tumor models, the transplantation of tumor cell lines is our model of choice for technical reasons. Injection of the tumor cell lines can be easily implemented in our transgenic and knockout models, as no time-consuming crosses between mouse lines are required to perform the experiments. Moreover, tumor cell lines with model antigens of T cells are readily available, enabling the study of tumor-specific T cell responses. The selection of the specific tumor cell line for transplantation will be based on the type and/or genetic abnormalities of the tumors in the patients that we would like to mimic. After implantation the cancer cells will form solid tumors or metastases, given that in general these transplantable tumor models are reproducible and robust in terms of tumor take rate and growth consistency.

To study the impact of immunotherapy on the growth and behavior of these tumors, the animals will be treated by adoptive T cell transfers. To this end, mice will receive intravenous injections of tumor-specific T cells before or after tumor challenge. The transferred T cells consist of isolated populations of naïve,

effector, memory or in vitro activated T cells of wildtype or TCR transgenic mice (e.g. OT-I or F5 mice). The naïve donor T cells come from mice on appendix 6. The effector or memory donor T cells come from tumor challenged mice on this protocol or from mice infected with influenza, LCMV or Listeria on distinct protocols under appendices 2-4 or after immunization on the distinct protocol described under appendix 7. In some cases, the transferred T cells carry additional genetically modified alleles. In this manner, the response and impact of the donor antigen-specific T cells can be analyzed.

In some experiments, we will employ immunotherapy through immunization of the mice. To enable these experiments, mice will be immunized with immunogens (antigens, TLR ligands, adjuvans etc) as described in detail in appendix 7 to study the protective effect against tumor challenge. It is also relevant to study the impact of therapeutic immunization (immunization after establishment of tumor growth), as in many cases help can only be offered to diseased individuals. Therefore, mice will be challenged with the tumor cell lines and subsequently be immunized with immunogens in a similar manner as described in detail in appendix 7.

We will use inbred mice on a common background, typically wildtype versus transgenic or knock out mice on a C57BL/6 background in the tumor challenge experiments. Alternatively, mixed bone marrow chimeric mice will be used that have a wildtype and / or a transgenic / knockout compartment. We will employ this strategy to ensure that the tumor challenge is similarly controlled in the wildtype and in the transgenic setting. Mixed bone marrow chimeric mice will be generated by 2x irradiation (typically 4 to 5 Gray) of recipient mice and adoptive transfer of donor bone marrow by intravenous injection. Mice will be used 2-3 months after bone marrow reconstitution. Injections with antibodies can be used to label immune populations (e.g circulating CD8 T cells with non-depleting anti-CD8 antibodies), to deplete immune or hematopoietic populations (e.g. CD8 T cells with depleting anti-CD8 antibodies), to rescue the survival of specific immune populations (e.g. ARTC2 nanobodies to rescue CD8 T cell subsets) or to block specific immune processes (e.g. anti-LFA1 antibodies to block adhesion/migration of immune cells). In addition, in some experiments, small molecule inhibitors will be used to block specific immune processes (e.g. FTY720 to block migration of immune cells). Some genetic models require the addition of doxycycline (eg tet on / tet off system), tamoxifen (eg the ERT2-CRE system), diphtheria toxin (eg DTR transgenic mice), poly IC (eg Mx1-CRE system) or other to be specified reagents to induce or suppress expression of the molecules of interest.

Small volumes of blood within the effective guidelines (no more than 300 ul blood per mouse per 14 days) will be drawn from the tail vein of the mice at various time points to study the kinetics of the immune response after infection. At the end of the experiment, the mice will be humanely euthanized to enable harvest of the organs (e.g. lymph nodes, spleen, bone marrow, liver, gut, kidneys and lungs) for study of the viral load and the immune response within these organs.

The aim of these experiments is to develop better adoptive T cell treatments to ultimately obtain results that may be applied / translated to the clinic.

Primary outcome parameters:

The clinical readout of the tumor models will be based on tumor progression (physical measurement of tumor size or imaging), survival (humane endpoints) and / or biological effect based on analysis following the resection / collection of relevant tissue material.

The immune response will be monitored using flow cytometric analysis, which allows for the identification and the phenotyping of immune cell populations within different organs of experimental and control mice. The analysis of these immune cell populations will allow assessment of the degree of inflammation and determination of the size and type of innate and adaptive immune responses (e.g. the responses of monocytes, neutrophils, CD4 and CD8 T cells, and B cells). In addition to flow cytometry, histology will be used to assess inflammation and pathology within the tumor. Measurements of tumor growth are performed to study the impact of the immune system in controlling the tumor tissue. *In vitro* experiments will be performed with immune cells from the isolated tissues to assess the potential of the immune cells in restimulation experiments.

For some experiments, we will employ intravital imaging to study in vivo T cell responses. For this purpose, tumor-bearing animals will be anesthetized using isoflurane. The tissue of interest (tumor) will be prepared and positioned to enable in vivo imaging. The animals will be kept on a heating pad during the imaging procedure for maintenance of body temperature. In vivo imaging will take no more than 4 hours per animal and after the procedure the animals are euthanized using CO₂ asphyxiation.

We expect that 50% of the mice will experience primary tumor challenge and that 50% will experience metastasis challenge. We expect that 33.3% of the mice will not receive further treatment besides the tumor challenge, 33.3% will receive adoptive transfers of immune or hematopoietic cells and 33.3% will receive immunizations or other treatments as described above. From the majority of the mice (90%) blood will be taken prior to sacrifice. A minority of the mice will be analyzed by intravital imaging (less than 10%). All mice will be sacrificed at the end of the experiment.

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

Nature:

1: Ectopic or systemic transplantation

Induction of ectopic tumors typically occurs via subcutaneous injection and induction of metastases occurs typically through intravenous injection of tumor cell suspensions of a cell line into an animal. If necessary, the applications will be performed under appropriate anesthesia and analgesia. As a result of the transplantation procedures, tumors or metastases will develop, but time of onset and speed of growth will vary per model. In general, models with a high tumor take rate and consistent tumor growth will be used. A tumor model that has less optimal take rate and consistency may be used, but only in such cases, in which a tumor model has unique features that are not available in other models. For example, there are just a few human Her2 expressing breast cancer cell lines that are available, but most of them have a relatively poor tumor take. Many tumor models are already available or will be developed and characterized under a separate CCD project license. However, when such models, such as existing cell lines from the ATCC or other collaborators are introduced into our animal facility, it will be necessary to run a pilot test to determine/confirm the tumor take rate and growth consistency.

2: Tumor development and progression follow-up

In case of superficial tumors we can use palpation and/or caliper measurement to measure tumor growth. To this end, the mouse will be fixed by hand and the tumor palpated. Tumors larger than about 3x3x3 mm will be measured by calipers. In cases of follow up of tumor volume when tumors are not superficial and/or to obtain biological information from the tumor (growing superficial and inside internal organ sites), we will need to use appropriate imaging techniques (IVIS, SPECT, MRI, PET, CT and/or ultrasound). Examples are to monitor distribution of a radiolabeled antibody or to measure apoptosis by ^{99m}Tc-Annexin. As part of the imaging procedure, the injection of a radioactive tracer (for PET and SPECT) or contrasting agent (MRI, CT, ultrasound) may be used. If not yet available, these imaging procedures will be developed and validated under a separate CCD project license. In some cases, tumor cells have been transduced with soluble luciferase and blood sampling (25 ul from the tail) can then be used to monitor tumor growth. Duration and frequency varies between 5-10 minutes (typical for optical imaging (IVIS) or ultrasound to more than an hour for MRI, PET, SPECT and CT. During the imaging procedures the animals will be unconscious under anesthesia. For long term anesthesia (MRI, PET, SPECT and CT) we will use a dedicated life monitoring system that will record respiration rate and control body temperature to minimize any negative impact on the condition of the animal by the duration of the anesthesia. For ultrasound imaging the hair on the skin will be shaved. Food fasting of animal (with access to water) for a maximum of 12 hours can be part of the imaging procedure, such as for FDG.

3: T cell transfer

To study how T cells can be applied in tumor clearance, naïve, effector, memory or in vitro activated T cells of wildtype or TCR transgenic mice (e.g. OT-I mice) will be isolated and transferred into recipient mice before or after tumor challenge. In this manner, the anti-tumor response of the donor T cells will be followed over time. In parallel, the impact of the transferred T cells on tumor growth will be analyzed.

4: Euthanasia

At the end of the study the animal will be killed by an approved method (e.g. CO₂ asphyxiation, cervical dislocation or overdosis anesthesia).

Frequency:

Tumor challenge will occur once per mouse for the study of anti-tumor T cell responses.

Mice will typically be bled once or twice only to establish the size of the systemic anti-tumor T cell response. In some experiments, mice will be bled more frequently to follow kinetics of the response, starting from day 1 after tumor challenge and maximally 5 times and no more frequently than every other day.

Duration:

Inoculation of the mice with tumor cells takes no more than 5 minutes. It is expected to cause only mild discomfort for less than one day due to the inoculation. After inoculation of the tumor cells, the mice experience moderate discomfort (primary tumor model) or severe discomfort (metastasis model) due to tumor growth for a period, which depends on the tumor model. In general, humane endpoints are reached within 3-8 weeks. Importantly, in many cases, mice will be sacrificed at earlier time-points to study the developing anti-tumor innate and adaptive immune responses.

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

A typical tumor challenge study will comprise several study arms (eg control group(s) versus treatment groups). To demonstrate a 50% improvement in terms of tumor growth rate or survival between two groups (test vs controls) with the overall variability (relative standard deviation) being around 30, we will need a group size of 8 evaluable animals per group (power > 0.9 with $\alpha = 0.05$, two sided). In order to obtain sufficient evaluable animals we will need more animals, as not all mice develop a tumor, or develop a tumor outside the predefined time window (too rapid, too slow). These mice will be taken off-study (censored). Whenever possible we will use models with high tumor take and consistent growth characteristics, but some models may have a lower take rate. Overall, we expect that on average about 25% of the tumor challenged mice cannot be used for this reason. Consequently, we will need a group size of 11 animals per study arm, thus $2 \times 11 = 22$ animals per study. Randomization/stratification of the mice will take place once the tumor has reached a predefined size in a predefined time window.

B. The animals

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

Species

We will use inbred mice, because the immune response in these mice is well characterized and the reagents to measure the immune cell populations are available. Mice are considered the most appropriate and, therefore, most frequently used animal model in oncology because of their short generation time and the ease of genetic modifications. Like humans, they are mammals with similar organ structures, sharing many similarities in genetic composition. There is a wealth of information on -omics data and many advanced bio-molecular tools for genetic modification are available. Moreover, there is a wide range of available tumor models, cell lines, xenografts that are transplantable into (immune compromised) mice. Usage of inbred strains also reduces genetic variability and thus minimizes the number of required animals. The proposed tumor models are well-established mouse models, with which we have extensive prior experience. The availability of inbred strains (to enhance reproducibility) and genetically modified strains makes this the best model system to study the immune response to tumor challenge in vivo.

For the experimentation, the gender of the mice is in most cases not relevant, which allows for optimal use of female and male mice from available stock.

Origin

Animals will be obtained through in-house breeding for wildtype or transgenic or knockout mouse lines. When available, littermates will be used in experiments as controls. If required, wild-type inbred control mice will be purchased from a certified commercial supplier to serve as controls.

Estimated numbers:

We expect to perform 20 studies with tumor models (primary and metastatic tumor models combined) per year, resulting in a total of $20 \times 22 = 440$ mice per year (**2200 in 5 years**). Of note is that only about 75% of these mice will actually be included in the studies and will undergo the discomfort of the handlings. The remaining 25% will not be eligible for study (e.g. no tumor take or too long tumor latency) and will be humanely killed before discomfort due to tumor growth will occur.

Life Stages

Young adult mice of approximately 8-16 weeks old will be used, as these mice have fully developed

immune populations for protection against tumor challenge in the experiments. In case bone marrow chimeric mice are used, mice will be 4-6 months old due to the time it takes to reconstitute the immune compartments.

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:

Evaluations of the proposed concepts are being done in cell culture experiments and in infection experiments prior to the tumor challenge experiments. The results thereof are evaluated critically and only if these tests/concepts are considered sufficiently promising, the step towards in vivo testing in tumor experiments will be taken. Since cancer is a complex disease, it is necessary to study the treatment of the disease in vivo. Cell culture, organoids or computer models, are not sophisticated enough for this purpose as the interaction between the tumor and host environmental factors such as the stroma, oxygen supply, the immune system and metabolism is not accounted for. Therefore, replacement of the tumor challenge experiments is not possible.

Reduction:

The proposed number of evaluable animals per study arm (n=11) is based on our experience with this type of experiments and in line with generally accepted protocols in the literature. Further reduction of animal numbers per cohort will deteriorate the statistical power.

Refinement:

State-of-the-art methods and equipment for tumor induction and follow up of tumor growth (imaging) will be used to minimize discomfort to the animals.

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

We realize that the procedures/handlings that will be conducted under this protocol will inevitably cause suffering of the animals in these studies. In order to minimize suffering, we will adhere to the national (Code of Practice) and internationally accepted rules (Code of Practice) of handling lab animals in oncology (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102: 1555-1577). Under these rules, the animals will be humanely killed when the humane endpoint is reached. Within the Institute, we have standard operation procedures (SOP) for animal handlings. Importantly, this also includes a SOP for analgesia that should reduce suffering from pain to a minimum. Next to that, we will use state-of-the-art imaging techniques that allow for non-invasive follow up of tumor growth, which is important in case of tumors growing inside internal organs, as this will help to identify animals at risk for developing symptoms. While under anesthesia for imaging, the animals are kept in a temperature controlled environment. For long term imaging (MRI, PET/SPECT/CT) the respiration will be checked to balance the depth of the anesthesia using Life-monitoring systems.

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.

In some case isoflurane anesthesia is necessary for the inoculation of the tumor cells. After tumor challenge, no measures can be taken to relieve pain, as such measures will interfere with the immune response that we intend to study.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Animals will be monitored using appropriate techniques and at a frequency that is appropriate for the model. The discomfort caused by the tumor will depend on the model. In general, moderate for superficial tumors such as skin and mammary tumors that do not cause symptomatic metastases. The discomfort caused by tumors or metastases growing inside internal organs can be severe when grown to a size that the humane endpoints are reached (e.g. loss of body weight >20% of the initial weight, abnormal breathing, abnormal posture, etc.). Animals carrying tumors in internal organs may develop dysfunction of involved organs or other complications (e.g. obstruction of airway or gastro-intestinal tract) just like cancer patients.

Explain why these effects may emerge.

These effects are a consequence of tumor growth and treatments

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

In general the negative effects on the well-being of the animals by the tumor cannot be prevented. In order to minimize the burden of the tumor, the animals will be monitored at a frequency that is dictated by the model and timely killed when the humane endpoint as described below is met. Nevertheless, unforeseen complications may occur. In such cases, we will try to find solutions that will minimize the impact of the unforeseen complications, for example by providing easy access to food (mush-feeding), taking into account the humane endpoints as listed below.

In case bone marrow chimeric mice are used in the experiments discomfort due to irradiation may arise (irradiation sickness). The irradiation is required to eliminate the host compartment of the immune system to make space for the donor bone marrow. The effects are transient (less than 2 weeks) as reconstitution with donor bone marrow results in full recovery of the irradiated mice. In rare cases when reconstitution is insufficient, irradiated mice will be eliminated on similar criteria as after infection as described under humane endpoints.

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.

We will adhere to the Code of Practice of lab animals used in oncology, in line with internationally agreed rules (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102: 1555-1577). In general the most important humane endpoints that apply are:

- A weight loss of more than 20% of the initial body weight, measured from the start of the treatment and in case of adult animals.
- A tumor mass greater than 10% of the body weight, usually 2000 cubic mm in case of more superficial measurable lesions (by caliper) and/or skin ulceration/necrosis.
- Severe abnormal breathing.

Indicate the likely incidence.

Mice are unable to clear tumors unless therapy is successful. Therefore, humane endpoints are required in survival experiments. Often, mice are killed at an earlier stage to study the anti-tumor immune response.

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').

We expect that up to 25% of the mice will be taken out of experiment, because they will not have tumor take. Due to failure of tumor development, these mice will be terminated with mild discomfort only. The remainder of the mice will develop a tumor and / or metastases. The expected level of discomfort associated with tumor challenge is moderate (37.5% of the mice) and with metastasis challenge severe (37.5% of the mice).

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.

The animals need to be euthanized at the end of the experiment in order to harvest vital organs at key time points post infection. This is necessary in order to measure and assess immune responses in target organs of the infection and in the lymphoid organs. In some experiments, the condition of the animals at the end of the experiment will require that the animal is humanely killed.

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

- 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'.	30100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 06	Type of animal procedure Homeostasis studies

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.

General design of animal procedures:

The primary purpose of the in vitro studies is to obtain organs, tissues and cells from mice for use in the experiments. In particular, T cells or other immune cells are isolated from the obtained material to set up in vitro cultures. These cultures will be used to analyze optimal strategies for the expansion and maintenance of T cells or other immune cells. In addition, the cultured immune cells, in particular T cells, will be used as donor cells in adoptive transfer studies. In the adoptive transfer experiments, we will require donor cells from mice that do not undergo infection or tumor challenge themselves. These donor mice will be analyzed on this protocol. In case the recipient mice undergo immunization, infection or tumor challenge, these mice will be analyzed on the appropriate protocols in appendices 2-5 and 7. Finally, the in vitro experiments also include a wide array of experimental approaches to study T cell differentiation under steady state conditions including transcriptional profiling, flow cytometry, mass spectrometry, histology and other approaches.

We will also employ an alternative approach to study immune cells under homeostatic conditions after adoptive transfer. For this purpose, immune cells, in particular T cells of wildtype or TCR transgenic mice (e.g. P14 mice), in some cases carrying additional genetically modified alleles, will be isolated and transferred into recipient mice. The mice providing donor cells for these responses come from this appendix (steady state mice) or from mice that have been infected, challenged with tumor cells or immunized on appendix 2, 3, 4, 5 or 7. The recipient mice will subsequently be sacrificed for analysis without prior immunization, infection or tumor challenge. In this manner, the donor immune cells, often antigen-specific T cells, can be analyzed at distinct time-points after adoptive transfer.

We will use inbred mice on a common background, typically wildtype versus transgenic or knock out mice

on a C57BL/6 background in the homeostasis experiments. Alternatively, mixed bone marrow chimeric mice will be used that have a wildtype and / or a transgenic / knockout compartment. We will employ a chimeric strategy to ensure a similar environment of wildtype and the transgenic compartment. Mixed bone marrow chimeric mice will be generated by 2x irradiation (typically 4 to 5 Gray) of recipient mice and adoptive transfer of donor bone marrow by intravenous injection. Mice will be used 2-3 months after bone marrow reconstitution. It should be noted that the making of bone marrow chimeric mice as described under appendix 2, 3, 4, 5 and 7 will require donor bone marrow from mice that did not undergo further experimental procedures before sacrifice. These donor mice are sacrificed on this protocol to obtain the required bone marrow. Injections with antibodies can be used to label immune populations (e.g circulating CD8 T cells with non-depleting anti-CD8 antibodies), to deplete immune or hematopoietic populations (e.g. CD8 T cells with depleting anti-CD8 antibodies), to rescue the survival of specific immune populations (e.g. ARTC2 nanobodies to rescue CD8 T cell subsets) or to block specific immune processes (e.g. anti-LFA1 antibodies to block adhesion/migration of immune cells). In addition, in some experiments, small molecule inhibitors will be used to block specific immune processes (e.g. FTY720 to block migration of immune cells). Some genetic models require the addition of doxycycline (eg tet on / tet off system), tamoxifen (eg the ERT2-CRE system), diphtheria toxin (eg DTR transgenic mice), poly IC (eg Mx1-CRE system) or other to be specified reagents to induce or suppress expression of the molecules of interest.

In some cases, small volumes of blood within the effective guidelines (no more than 300 ul blood per mouse per 14 days) will be drawn from the tail vein of the mice before sacrifice.

At the end of the experiment, the mice will be humanely euthanized to enable harvest of the organs (e.g. lymph nodes, spleen, bone marrow, liver, gut, kidneys and lungs) for analysis and / or culture of the immune cells within these organs.

Primary outcome parameters:

Steady state populations of immune cells will be monitored using flow cytometric analysis, which allows for the identification and the phenotyping of immune cell populations (e.g. monocytes, neutrophils, CD4 and CD8 T cells, and B cells) within different organs of the mice. The analysis of these immune cell populations will allow assessment of innate and adaptive immunity under steady state conditions. In addition to flow cytometry, histology will be used to assess the location of immune populations within the organs (e.g. lymph nodes, spleen, bone marrow, liver, gut, kidneys and lungs). *In vitro* experiments will be performed with immune cells from the isolated tissues to assess the potential of the immune cells in *in vitro* stimulation experiments.

For some experiments, we will employ intravital imaging to study the *in vivo* activity of immune cells, in particular T cells. For this purpose, animals kept under steady state conditions will be anesthetized using isoflurane. The tissue of interest will be prepared and positioned to enable *in vivo* imaging. The animals will be kept on a heating pad during the imaging procedure for maintenance of body temperature. *In vivo* imaging will take no more than 4 hours per animal and after the procedure the animals are euthanized using CO2 asphyxiation.

We expect that 60% of the mice will not receive any treatment before sacrifice, 20% will receive adoptive transfers of immune or hematopoietic cells and 20% will receive other treatments as described above. From a proportion of the mice (40%) blood will be taken prior to sacrifice. A minority of the mice will be analyzed by intravital imaging (less than 10%). All mice will be sacrificed at the end of the experiment.

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

Nature

Animals will be euthanized without prior infection or tumor challenge to obtain organs, tissues and cell preparations. However, a substantial proportion of the animals will receive adoptive transfer of immune cells, antibody treatment or other treatments as described above. Euthanization will be performed using CO2 asphyxiation or cervical dislocation, as these procedures limit discomfort of the mice and allow for optimal isolation of the material.

Frequency

Mice will typically be bled once or twice only to establish the efficacy of infection (assessed by the size of the virus-specific T cell response). In some experiments, mice will be bled more frequently to follow

kinetics of the response (no more than 300 ul per mouse per 14 days).

Duration

Mice will be analyzed directly (sacrifice without prior treatment) or within 90 days after treatment consisting of adoptive transfer of immune cells, antibody treatment or other treatments as described above.

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

In order to minimize the number of animals required to achieve scientifically reliable and reproducible data, the number of animals required for the experiments is calculated through power analysis. Normally distributed data will ultimately be tested by student's t test or ANOVA depending on the number of groups or variables that will be measured. Non-parametric tests will be applied in the absence of a normal distribution and power testing will take that into account. The exact groups sizes will be calculated based on power analysis and approved in conjunction with the institutional animal welfare body (IvD).

The availability of cells from the tissues is often a limitation in *in vitro studies*. Pooling of material from several mice may in many cases be required to obtain sufficient cell numbers for experimentation. Therefore, in addition to statistical methods an important consideration to calculate the required mice for *in vitro* studies is the number of mice that are necessary to obtain sufficient cells for analysis. Therefore, we will choose experimental approaches that minimize the amount of mice needed per sample.

To minimize the number of mice used for in vitro experiments, we will also optimally use the available tissues through sharing of the available material of sacrificed mice.

B. The animals

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

The animals are obtained from registered commercial or in-house suppliers or through in-house generation of new lines. Mice used for the in vitro experiments can be wild-type or genetically modified animals in the young adult range of life (approximately 8 to 16 weeks). For some experiments younger mice are used (1 to 8 weeks) to study the stages of T cell development that occur from pup to adulthood (less than 5% of the experiments). For other experiments, older mice up to 1 year of age are used to study the effect of aging on T cell differentiation (less than 5% of the experiments). In case bone marrow chimeric mice are used, mice will be 4-6 months old due to the time it takes to reconstitute the immune compartments. For the experimentation, the gender of the mice is in most cases not relevant, which allows for optimal use of female and male mice from available stock.

The estimated number of mice for use in *in vitro* experiments depends on the type of assay, the amount of available cells, the number of experimental conditions during culture and the number of analyzed genotypes. It should be noted that the number of available cells per mouse can be very low for certain rare cell types (eg certain types of memory T cells) and therefore require the pooling of cells from several mice for one experiment. For example, mass spectrometry analysis requires cell numbers in the order of 1×10^6 cells, whereas T cell populations are in the order of 1×10^5 cells, necessitating 10 mice per sample. Based on the large number of variables in the above considerations, a statistical approach is not feasible. We expect to use up to 2000 mice per year resulting in 10,000 mice in total on this protocol.

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:

Material of mice will be used for in vitro study of immune cell biology. Although human immune cells can be used for some purposes, the possibility to use genetically modified mice still makes this organism essential to understand immune cell biology at the molecular level.

In addition, the in vitro experiments are also essential to support the infection experiments of this application. The experiments are designed to minimize the amount of animals used in infection experiments, as the information obtained in the in vitro studies will be used to optimize settings for the infection experiments. Therefore, we expect that using mice in vitro experiments can limit the usage of mice in infection experiments.

Reduction:

Power analyses will be done for each animal procedure to determine the minimum sample size of each group. The power analysis will be reviewed by the institutional animal welfare body (IvD) in order to obtain statistically significant and biologically relevant readouts from the proposed experiments. We manage to minimize the number of mice for these experiments by using inbred and therefore genetically identical mouse strains. This allows for smaller sample sizes and thus usage of lower total amounts of animals. We will further reduce the number of mice by optimal usage of the tissues of sacrificed animals for different experiments that can be run in parallel.

Refinement:

Animals are housed together in stable social groups with nesting and cage accessories (e.g. cage furniture) for their comfort until sacrifice for analysis.

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

The mice are killed for direct use of tissues in in vitro experiments or after experimental procedures that induce mild discomfort only (injection of antibodies, adoptive transfer of cells, and other treatments as described above). Therefore, measures to minimize suffering other than those related to the killing of the mice are not applicable. Animals are euthanized using CO2 asphyxiation or cervical dislocation as these procedures induce rapid death with minimal associated discomfort.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Most animals (60%) are directly terminated for use in in vitro experiments and therefore adverse effects other than those related to termination of the mice cannot occur. The remainder of the mice (40%) will experience only mild discomfort due to adoptive transfer of immune cells, injection of antibodies and other procedures as described under A that are unlikely to include further adverse effects.

In case bone marrow chimeric mice are used in the experiments discomfort due to irradiation may arise (irradiation sickness). The irradiation is required to eliminate the host compartment of the immune system to make space for the donor bone marrow. The effects are transient (less than 2 weeks) as reconstitution with donor bone marrow results in full recovery of the irradiated mice. In rare cases when reconstitution is insufficient, irradiated mice will be eliminated on similar criteria as after infection as described under humane endpoints.

Explain why these effects may emerge.

Not applicable

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

The sacrifice of the animals will occur in a humane manner using CO2 asphyxiation or cervical dislocation. These methods ensure rapid death with minimal levels of associated discomfort in the procedure.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

The expected level of discomfort is mild for all of the mice with the exception of mice that are used as recipients in the making of bone marrow chimeric mice. We expect to use 500 mice for these purposes. Therefore, 95% of the mice will experience mild discomfort and 5% moderate discomfort.

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.

It is necessary to kill the animals to obtain tissues including lymph nodes, spleen, liver, gut and kidneys and white blood cells from these tissues for use in *in vitro* experiments

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.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'.	30100	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Het Nederlands Kanker Instituut – Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 07	Type of animal procedure Immunization

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.

General design of animal procedures:

We will make use of immunization strategies to study the impact of antigens and / or adjuvants on immune responses. To stimulate antigen-specific T cell populations, T cell model proteins and peptide antigens such as for example ovalbumin protein or peptides derived of ovalbumin will be used. To activate innate populations of T cells, we will make use of their cognate antigens that include for example alpha-GalCer for NKT cells. To stimulate large populations of T cells, we will make use of T cell super-antigens (such as Mls-1, staphylococcus enterotoxin A and B (SEA and SEB), TSST-1 and SPEA) that will enable the activation of T cells independent of their cognate antigen. We will employ T cell-dependent and T cell-independent B cell antigens (including TNP/NP-Ficoll, TNP/NP-keyhole limpet hemocyanin (KLH), TNP/NP-chicken gamma-globulin (CGG), r-phycoerythrin (R-PE), and hen egg lysozyme (HEL)) to study the impact of T cell help on B cell responses. Antigenic stimulation of T cells will be used in the presence of adjuvants to boost and / or modify T cell responses. Adjuvants such as incomplete Freund's adjuvants (IFA) and alum induce antigen precipitation to ensure that an antigen depot remains present, thereby increasing the timeframe, in which antigens can stimulate immune responses. Stimulants of pattern recognition receptors such as the Toll-like receptor (TLR) ligands CpG, poly-IC, LPS, ATP and NAD will also be used as adjuvants, as they stimulate antigen-presenting cells (APCs), which enhances the capacity of these APCs to induce T cell responses. Also stimulants that induce local or systemic sterile inflammation such as DNFB (skin), DNBS (gut) and paracetamol (liver) will be applied to study resulting immune responses.

We will study primary immune responses. We are interested in early timepoints (up to day 5 p.i.) to study innate responses, in the peak of the primary adaptive response at day 6 to 10 p.i. to study the formation of adaptive responses, in the contraction of the adaptive response (day 11 to 14 p.i.), and in the memory phase of the adaptive response (after day 14 p.i.).

We will use prime-boost strategies to study recall responses. For this purpose, mice will be sequentially immunized and

challenged (in some cases more than two times) with the antigens mentioned above. After the sequential immunizations, the recall response will be followed at similar time-points as displayed above for the primary immune response.

We will also employ an alternative approach to study primary and recall responses using adoptive transfer of T cells. To study primary responses, naïve T cells of wildtype or TCR transgenic mice (e.g. OT-I or F5 mice), in some cases carrying additional genetically modified alleles, will be isolated and transferred into recipient mice that will subsequently be immunized. The mice providing donor cells for primary responses come from appendix 6. In this manner, the primary response of the donor antigen-specific T cells can be analyzed at similar time-points as described above for endogenous T cells. To study secondary responses, memory or *in vitro* activated T cells of wildtype or TCR transgenic mice will be isolated and transferred using intravenous injection into recipient mice that will subsequently be immunized. The mice providing donor cells for secondary responses come from this appendix (immunized mice) or appendix 2, 3, 4 or 5. In this manner, the secondary response of the donor antigen-specific T cells can be analyzed at similar time-points as described above for endogenous T cells.

The ultimate purpose of the immunizations is to study whether the procedures provide protection against infection or against tumor challenge. These experiments will not be performed on this protocol, but as described on the protocols in appendices 2-5, in which the infection and tumor challenge experiments are described.

We will use inbred mice on a common background, typically wildtype versus transgenic or knock out mice on a C57BL/6 background in the immunization experiments. Alternatively, mixed bone marrow chimeric mice will be used that have a wildtype and / or a transgenic / knockout compartment. We will employ this strategy to ensure the wildtype and in the transgenic setting. Mixed bone marrow chimeric mice will be generated by 2x irradiation (typically 4 to 5 Gray) of recipient mice and adoptive transfer of donor bone marrow by intravenous injection. Mice will be used 2-3 months after bone marrow reconstitution. Injections with antibodies can be used to label immune populations (e.g. circulating CD8 T cells with non-depleting anti-CD8 antibodies), to deplete immune or hematopoietic populations (e.g. CD8 T cells with depleting anti-CD8 antibodies), to rescue the survival of specific immune populations (e.g. ARTC2 nanobodies to rescue CD8 T cell subsets) or to block specific immune processes (e.g. anti-LFA1 antibodies to block adhesion/migration of immune cells). In addition, in some experiments, small molecule inhibitors will be used to block specific immune processes (e.g. FTY720 to block migration of immune cells). Some genetic models require the addition of doxycycline (eg tet on / tet off system), tamoxifen (eg the ERT2-CRE system), diphtheria toxin (eg DTR transgenic mice), poly IC (eg Mx1-CRE system) or other to be specified reagents to induce or suppress expression of the molecules of interest.

Small volumes of blood within the effective guidelines (no more than 300 ul blood per mouse per 14 days) will be drawn at various time points to study the kinetics of the immune response after immunization. At the end of the experiment, the mice will be humanely euthanized to enable harvest of the organs (e.g. lymph nodes, spleen, bone marrow, liver, gut, kidneys and lungs) for study of the immune response within these organs.

Primary outcome parameters:

The immune response will be monitored using flow cytometric analysis, which allows for the identification and the phenotyping of immune cell populations within different organs of experimental and control mice. The analysis of these immune cell populations will allow assessment of the degree of inflammation and determination of the size and type of innate and adaptive immune responses (e.g. the responses of monocytes, neutrophils, CD4 and CD8 T cells, and B cells). In addition to flow cytometry, histology will be used to assess inflammation and pathology within the organs (e.g. lymph nodes, spleen, bone marrow, liver, gut, kidneys and lungs). *In vitro* experiments will be performed with immune cells from the isolated tissues to assess the potential of the immune cells in restimulation experiments. In some experiments, antibody titers will be determined by ELISA.

For some experiments, we will employ intravital imaging to study *in vivo* T cell responses. For this purpose, immunized animals will be anesthetized using isoflurane. The tissue of interest will be prepared and positioned to enable *in vivo* imaging. The animals will be kept on a heating pad during the imaging procedure for maintenance of body temperature. *In vivo* imaging will take no more than 4 hours per animal and after the procedure the animals are euthanized using CO₂ asphyxiation.

We expect that 50% of the mice will experience one immunization and that 50% will experience multiple prime boost immunizations of which the majority (90%) will receive no more than one recall challenge. We expect that 33.3% of the mice will not receive further treatment besides the immunizations, 33.3% will receive adoptive transfers of immune or hematopoietic cells and 33.3% will receive other treatments as described above. From the majority of the mice (90%) blood will be taken prior to sacrifice. A minority of the mice will be analyzed by intravital imaging (less than 10%). All mice will be sacrificed at the end of the experiment.

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

Nature:

Mice with an inbred background (e.g. C57BL/6) will be inoculated with the immunization reagents mentioned above. If

concentrations have not been previously determined, stocks of immunization reagents will be carefully validated *in vivo* using titration experiments. The immunization agents will be inoculated in PBS in a volume of max 200 microliters unless indicated otherwise below. Immunizations are applied through different routes to target different organs: intranasal inhalation under isoflurane anesthesia will be done for local immunization of the lungs (max 50 ul), intraperitoneal or intravenous injection for systemic immunization, subcutaneous or intradermal injection (max 5x 10 ul) for local immunization of the skin, and intramuscular immunization to mimic the commonly used immunization route in humans for vaccination.

Frequency

Immunization will occur once per mouse for the study of primary responses and multiple times (up to 10 times) for the study of recall responses.

Mice will typically be bled once or twice only to establish the efficacy of immunization (assessed by the size of the T cell response). In some experiments, mice will be bled more frequently to follow kinetics of the response, starting from day 1 after immunization and maximally 5 times and no more frequently than every other day.

Duration

Inoculation of the mice with the immunization reagents takes no more than 5 minutes. It is expected to cause only mild discomfort for less than one day due to the inoculation. After the onset of inflammation, the mice may experience mild discomfort for a maximum period of 7 to 14 days. During this period, mice are in general asymptomatic, but in some cases may lose up to 20% of their starting body weight, and transiently show visible signs of discomfort (hunched posture, reduced activity and ruffled fur). Importantly, immunization reagents are carefully titrated to be at the minimal doses that achieve a robust innate and adaptive immune response. It is also important to note that these signs of discomfort are transient and mice will completely recover within 14 days after immunization. Mice will be in experiment for up to 90 days after immunization unless in unusual cases the longevity of the memory T cells is studied. In case of re-challenge experiments, mice can be in experiment for 90 days after the last immunization (e.g. 180 days for a secondary immunization).

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

In order to minimize the number of animals required to achieve scientifically reliable and reproducible data, the number of animals required for the experiments is calculated through power analysis. Normally distributed data will ultimately be tested by student's t test or ANOVA depending on the number of groups or variables that will be measured. Non-parametric tests will be applied in the absence of a normal distribution and power testing will take that into account.

To exemplify, an immunization experiment will typically comprise two study arms (eg control group versus knockout group). To demonstrate a 50% improvement in terms of immune response size between two groups (test vs controls) with the overall variability (relative standard deviation) being around 30, we will need a group size of 5 evaluable animals per group (power > 0.8 with $\alpha = 0.05$, two sided). The immunization models are very consistent, and therefore, we expect only minimal loss of mice due to the inability to achieve immunization or due to other causes (less than 10%). Thus, to account for losses during experimentation we will use 6 mice per group in this experiment. Consequently, we will need a group size of 6 animals per study arm, thus $2 \times 6 = 12$ animals per study.

The above example may not be representative for all of the experiments under this appendix. The exact group sizes will for instance depend on the number of groups and the parameters that will be analyzed in any given experiment. Therefore, each experiment will require separate power analyses and approval of the institutional animal welfare body (IvD) to determine the relevant group sizes.

B. The animals

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

Species

We will use inbred mice, because the immune response in these mice is well characterized and the reagents to measure the immune cell populations are available. Usage of inbred strains also reduces genetic variability and thus minimizes the number of required animals. The proposed immunization models are well-established mouse models to study immune responses, with which we have extensive prior experience. The availability of inbred strains (to enhance reproducibility) and genetically modified strains makes this the best model system to study the impact of immunization strategies on immune responses.

For the experimentation, the gender of the mice is in most cases not relevant, which allows for optimal use of female and male mice from available stock.

Origin

Animals will be obtained through in-house breeding for wildtype or transgenic or knockout mouse lines. When available, littermates will be used in experiments as controls. If required, wild-type inbred control mice will be purchased from a certified commercial supplier to serve as controls.

Estimated Numbers

We will require approximately 2880 mice for these immunization models.

These numbers are calculated based upon the number of molecules assessed, the number of time points, the number of immune therapies including cell transfers and immunizations and the number of groups and the size of the group. In the five years of the project, we expect to study 10 molecules after infection. These targets are assessed at four time points after single immunization and at four time points after prime boost immunization. We expect to study the role of these molecules in 3 different settings (control, adoptive T cell transfer and after other treatments as described above). For each time point two groups are examined (group 1: 6 control mice, group 2: 6 experimental mice). This requires 10 molecules x 3 settings x 8 time points x 6 animals x 2 groups = 2880 animals.

Life Stages

Young adult mice of approximately 8-16 weeks old will be used, as these mice have fully developed immune populations that are required to study the impact of the immunization experiments. In case bone marrow chimeric mice are used, mice will be 4-6 months old due to the time it takes to reconstitute the immune compartments.

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

Mice will be used in experiments to assess the impact of immunization strategies on the immune response. The immune response is a temporal cascade of complex interactions between different cell types, receptors, signaling molecules, transcription factors etc. *In vitro* studies using human samples or cell lines cannot mimic these complex interactions and no *in vitro* system exists for the generation of immune responses. There is also no computer modeling (*in silico*) that can accurately reproduce and predict the complex immune response of a living animal. Extensive searches in DB-ALM and ZEBET databases were also not able to suggest possible alternatives to the proposed animal experiments. Therefore, these studies can only be carried out in live animals.

The availability of inbred strains (to enhance reproducibility) and genetically modified strains makes the proposed immunization models the best systems to study potential effects on the immune response *in vivo*.

Reduction

Power analyses will be done for each animal procedure to determine the minimum sample size of each group. The power analysis will be reviewed by the institutional animal welfare body (IvD) in order to obtain statistically significant and biologically relevant readouts from the proposed experiments. We manage to minimize the number of mice for these experiments by using inbred and therefore genetically identical mouse strains. This allows for smaller sample sizes and thus usage of lower total amounts of animals. We have reduced these experiments to include only crucial time points during the immune response. In addition, we perform kinetic analyses of immune responses in blood without directly sacrificing the animals. As blood samples do not reflect immune cell populations within the organs, it is required that at selected time points subgroups of animals will be humanely killed to obtain the organs.

Refinement

Animals are housed together in stable social groups with nesting and cage accessories (e.g. cage furniture) for their comfort.

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

1) To minimize animal discomfort, all experiments will be performed with the minimal dose of immunization reagents that reproducibly generates a robust immune response. Animals will be housed in stable social groups at all times to minimize distress, as mice are social animals. Animals exhibiting any of the humane endpoints mentioned in Section J will be euthanized to reduce suffering.

2) There are no risks for adverse effects on the environment, as the mice and the used reagents are contained in standard facilities.

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.

After immunization, no measures can be taken to relieve pain, as such measures will interfere with the immune response that we intend to study.

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?

Mice inoculated with immunization reagents can demonstrate mild discomfort, as they may cause inflammation. The discomfort may include weight loss, reduced activity, ruffled fur and hunched posture. It is important to note that the discomfort is related to inflammation and is transient. The immunized mice do not demonstrate any symptoms of disease after clearance of the inoculated pro-inflammatory reagents. In most cases, reagents and related symptoms will clear within 7 to 14 days. In the proposed study, we include experimental time points of up to 90 days post immunization, which means that mice can be without discomfort during a large part of the experiment. It is known that occasionally some mice will demonstrate disease symptoms more severely than expected. If this occurs, these mice will be sacrificed according to the humane endpoints described below.

In case bone marrow chimeric mice are used in the experiments discomfort due to irradiation may arise (irradiation sickness). The irradiation is required to eliminate the host compartment of the immune system to make space for the donor bone marrow. The effects are transient (less than 2 weeks) as reconstitution with donor bone marrow results in full recovery of the irradiated mice. In rare cases when reconstitution is insufficient, irradiated mice will be eliminated on similar criteria as after infection as described under humane endpoints.

Explain why these effects may emerge.

These effects are a result of the inflammation that may cause moderate discomfort in the animals

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

The administration of analgesia is impossible, because of its potential inhibition of the immune response, which we intend to study in this project. To minimize severity of inflammation, we will use the inoculum used for immunization in the lowest possible dose that induces a robust and reproducible immune response in the mice without causing excessive discomfort.

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.

Removal from this study will be based on critical clinical criteria including: 1) weight loss indicative of more than 20% of the initial weight, 2) severe breathing problems, 3) absence of recovery of observed weight loss at day 14 after immunization and 4) any other serious symptoms of disease. In the case of sporadic or unpredicted problems, mice will be separated into different subgroups when possible (e.g. fighting), or killed humanely, if the health of the animal is impaired beyond the expected symptoms.

Indicate the likely incidence.

We expect the occurrence of such complications and subsequent removal based on the critical clinical parameters as rare (approximately 5% of experimental mice).

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 level of discomfort associated with immunized mice is moderate. In this appendix, 100% of the immunized mice will experience moderate discomfort.

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.

The animals need to be euthanized at the end of the experiment in order to harvest vital organs at key time points after the immunization. This is necessary in order to measure and assess immune responses in target organs of the immunization and in the lymphoid organs.

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

Dierexperimentencommissie NKI
 Plesmanlaan 121
 1066 CX AMSTERDAM



Centrale Commissie Dierproeven

8 juni 2017

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
2. Titel van het project: Study of immune cells after infection and tumor challenge to uncover fundamental principles to improve immunotherapy
3. Titel van de NTS: Studie aan immuuncellen na infectie en tumorchallenge om fundamentele principes te ontrafelen voor immunotherapie
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC NKI
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 24-02-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 08-03-2017 en 12-04-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 14-03-2017 – 23-03-2017 en 24-04-2017 – 02-05-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 23-03-2017 en 02-05-2017
 - advies aan CCD: 08-06-2017
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.
 - Datum:
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
 - Gestelde vraag / vragen:
 - Verstrekt(e) antwoord(en)

- Vragen (datum: 14-03-2017) en *antwoorden* (datum: 23-03-2017):

Algemeen:

- In het projectdeel en in de appendices worden erg veel details vermeld die voor een toetsing op projectniveau niet relevant zijn.
- De DEC doet de suggestie de kanker therapie doelstelling te relativeren en de aanvraag meer op fundamenteel onderzoek naar immunotherapie te richten. De DEC denkt dat de modellen (m.n. LCMV) wellicht ver van de reële kankersituaties staan: hoge en ook uniforme expressie van echt vreemde antigenen, daar waar in kanker de expressie misschien niet zo hoog en ook niet uniform zal zijn. Bovendien zullen de antigenen misschien niet 'echt' vreemd zijn.
- De DEC doet de suggestie meer te verduidelijken per appendix welk percentage van de dieren welk ongerief zal ondergaan.

Project Proposal

- 3.1. (2e alinea): de DEC doet de suggestie om een korte duidelijke uitleg van het principe van de checkpoint blockade therapy toe te voegen.
- 3.2 (laatste alinea): Dit is lang lopend onderzoek. De DEC doet de suggestie om de doelstelling te verduidelijken (Wat is al bereikt; wat denkt u komende 5 jaar te bereiken etc.). Hierbij kan ook verwezen worden naar de milestones zoals beschreven bij 3.4.3.

Appendix 1.

- 2B: Het aantal dieren dat wordt gevraagd lijkt de DEC laag. Het verdient aanbeveling dit goed na te gaan en uit te leggen hoe het aantal tot stand komt.
- 2H: de DEC meent dat de dieren mogelijk wel pijn kunnen ondervinden.
- 2J/K de DEC acht een mate van ongerief van meer dan "moderate" niet acceptabel voor het aanhouden van dieren en is van mening dat dieren die dit ervaren uit proef genomen moeten worden als ze niet worden gebruikt in een experimenteel protocol. Graag de tekst en de humane eindpunten hierop aanpassen.

Appendix 2 en 3

- 2H Graag aangeven dat de dieren wel pijn kunnen ondervinden en toelichten waarom en/of onder welke omstandigheden u afziet van pijnbestrijding.
- 2I/J Graag de reden van het gewichtsverlies toelichten en uitleggen onder welke omstandigheden gewichtsverlies tot een humaan eindpunt leidt.

Appendix 4 : zie appendix 2 en 3

- 2I De Dec verzoekt de onderzoeker de gevolgen van de bestraling te vermelden.

Appendix 5

- 2H: Graag aangeven dat de dieren wel pijn kunnen ondervinden en toelichten waarom en/of onder welke omstandigheden u afziet van pijnbestrijding. Onder A (bij 'Nature') wordt pijnbestrijding wel genoemd.

Appendix 6

- 2A: bij primary parameters staat dat er wel handelingen voorafgaand aan het doden met de dieren wordt gedaan. Dit is niet in overeenstemming met de volgende alinea waarin de procedures die de dieren ondergaan worden beschreven en de tekst beschreven bij I.

- 2A: de DEC verzoekt de onderzoeker bij de onderbouwing van de aantallen te beschrijven dat de afweging door de IvD zal worden gemaakt aan de hand van de experimenten waar de weefsels voor nodig zijn en dat het hier een orgaandonatie protocol betreft.
- 2K: de DEC beschouwt dit als een ex vivo protocol en verzoekt de onderzoeker het antwoord te herformuleren.
- Appendix 7
- 2H: Graag aangeven dat de dieren wel pijn kunnen ondervinden en toelichten waarom en/of onder welke omstandigheden u afziet van pijnbestrijding.
- 2I/K: de DEC meent dat “mild” te laag is ingeschat. Graag onderbouwen waarom u dat vindt en/of zonodig aanpassen.
- NTS: De DEC heeft een aantal redactionele en tekstuele opmerkingen gemaakt die er toe zouden moeten bijdragen dat de titel en de tekst beter de inhoud van het project dekken.
- *De aanvrager heeft een groot deel van de suggesties in de aanvraag en de NTS verwerkt en ook de antwoorden op de vragen grotendeels tot tevredenheid van de DEC in de aanvraag verwerkt. De DEC heeft daarop in tweede instantie nog aanvullende vragen gesteld.*
- 2^e ronde vragen (datum: 24-04-2017) en antwoorden (datum: 02-05-2017)

Proposal:

- -Algemeen m.b.t. 3.1: De DEC is van mening dat nog steeds te veel de nadruk wordt gelegd op het feit dat het hier om kankeronderzoek zou gaan. Dit scheidt een niet geheel juist beeld van het project.
- 3.2.: 2e laatste alinea: de DEC verzoekt de onderzoeker de “accomplishments” te onderbouwen met publicaties.
- 3.2.: laatste alinea: de DEC meent dat de vraag naar de “achievability” nog niet afdoende is beantwoord.

Appendix 1:

- 2B: de DEC is van mening dat de aantallen dieren in deze bijlage en het ongerief nog steeds niet navolgbaar zijn beschreven.
- H: graag verduidelijken dat geen pijnbestrijding zal worden gegeven; anesthesie is geen vorm van analgesie. Mochten dieren wel onverhoopt pijn ondervinden, dan gaat de DEC er van uit dat deze niet aangehouden worden.

Appendix 5

- de DEC blijft van mening dat het kankeraspect in deze bijlage meer gerelativeerd zou moeten worden, omdat vooral een immunologisch model beschreven wordt. De tumoren lijken vooral te zijn gekozen om hun (bekende) eigenschappen voor wat betreft hun interactie met het immuunsysteem.

Appendix 6

- K: volgens de DEC is voor alle dieren in deze appendix het ongerief “mild”.
- *Alle suggesties en antwoorden op de vragen zijn door de aanvrager verwerkt in de aanvraag en de NTS is overeenkomstig aangepast.*

9. 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. Geen van de DEC-leden is betrokken bij deze projectaanvraag.

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.

In dit project wordt met behulp van infectiemodellen en tumormodellen onderzoek gedaan naar intrinsieke en extrinsieke signalen die de T-cel differentiatie regelen, met de bedoeling om beïnvloedbare ("targetable") eigenschappen van T-cellen te vinden die kunnen worden ingezet voor het optimaliseren van immunotherapie, onder andere bij kanker. De inzichten zullen worden gebruikt om nieuwe immunotherapeutische strategieën te ontwerpen die vervolgens getest en vervolmaakt zullen worden in dezelfde modellen (challenge met infecties en tumoren). Voor het onderzoek worden bestaande (infectie)modellen gebruikt, met bekende infectieuze agentia en tumoren. De aanvrager hanteert een heldere, stapsgewijze strategie. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.
2. Voor zover de DEC weet is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie, fundamenteel onderzoek, is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het bestuderen van T-celdifferentiatie, om de intrinsieke en extrinsieke signalen die de differentiatie regelen te identificeren. Uiteindelijk moet dit leiden tot het vinden van beïnvloedbare ("targetable") eigenschappen van T-cellen die kunnen worden ingezet voor het optimaliseren van immunotherapie, onder andere bij kanker. Het uiteindelijke doel is dus het optimaliseren van immunotherapie door het ontwerpen van beter immunisatiestrategieën en in vitro protocollen voor het kweken van T-cellen die in staat zijn infecties en tumoren te bestrijden. Het verband tussen het directe doel en het uiteindelijke doel is niet direct aanwezig binnen dit project, maar op termijn wel reëel. Het doel van deze

projectaanvraag is gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers, het betreffende onderzoeksveld en op langere termijn patiënten en de samenleving.

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 ze belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten kunnen publiceren, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Naar de mening van de DEC dient dat geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Voor de rechtvaardiging van dit onderzoek gaat het uiteindelijk om de vraag of het belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis). Dit onderzoek is in de eerste plaats fundamenteel van aard en levert informatie en kennis op die van belang is voor de voortgang van het onderzoek in dit veld.

6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. Geïnfecteerde muizen worden conform de daarvoor geldende regels zo gehuisvest dat de betreffende micro-organismen niet in het milieu terecht kunnen komen.

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. 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 doelstellingen 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 vinden plaats 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. 41% Van de dieren ondergaat cumulatief licht ongerief, hoofdzakelijk als gevolg van bijvoorbeeld de adoptieve transfer van cellen en infecties die met lichte symptomen verlopen. 55% van de dieren ondergaat cumulatief matig ongerief, hoofdzakelijk als gevolg van een challenge met een tumor of infectie die verloopt met symptomen die tot matig ongerief leiden of door bestraling. Vier procent van de dieren ondergaat naar verwachting ernstig ongerief door challenge met tumoren die metastaseren of een ernstig verlopende influenza infectie. Dit laatste betreft uitsluitend de dieren die met een virulente influenzastrain worden geïnfecteerd. De wetenschappelijke noodzaak daarvoor is goed onderbouwd. Het cumulatief ongerief voor de dieren dient te worden ingeschat als licht voor 41% van de dieren, matig voor 55% van de dieren en ernstig voor 4% van de dieren.
12. Elke dierproef brengt instrumenteel gebruik van speciaal voor dat doel in gevangenschap gefokte dieren met zich mee, hetgeen op zich al opgevat kan worden als een aantasting van hun integriteit. Omdat dit voor elk project geldt, vermeldt de DEC hier alleen zaken die kenmerkend zijn voor dit specifieke project. De integriteit van de dieren wordt aangetast door het induceren van tumoren en het infecteren van de dieren met virussen en bacteriën die aandoeningen veroorzaken. Dit leidt in de eerste plaats tot een matige of ernstige aantasting van het welzijn, maar het valt niet uit te sluiten dat dit heeft ook invloed op het gedrag en zelfredzaamheid van de dieren.
13. Voor dieren waarbij een tumor wordt geïnduceerd worden de humane eindpunten van de Code of Practice voor dieren in het kankeronderzoek gehanteerd. In veel gevallen worden de dieren echter gedood voor analyse voordat ze een humaan eindpunt bereiken. Voor dieren met infectieziekten zijn heldere op de betreffende aandoeningen afgestemde humane eindpunten gedefinieerd die in de meeste gevallen ernstig ongerief zullen kunnen voorkomen. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op de experimenten. De commissie is het eens met de inschattingen en met de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De complexe interactie tussen een tumor en het immuunsysteem en de reactie van het immuunsysteem op een infectie kan op dit moment slechts in vivo bestudeerd worden. Voor een deel van de experimenten wordt voorafgaand in vitro onderzoek gedaan en ook wordt er waar mogelijk (ex vivo) onderzoek gedaan met weefsels van dieren die voor dat doel zijn gedood. Het is niet mogelijk om de vraagstellingen van dit project zonder proefdieren te beantwoorden.
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 mogelijk aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De dieren

worden niet langer dan noodzakelijk in het experiment gehouden en er worden adequate humane eindpunten gehanteerd. Daarbij wordt de "Code of Practice" voor het kankeronderzoek gevolgd. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het project betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager geeft aan dat het geslacht van de dieren in verreweg de meeste gevallen niet relevant is en verwacht in het project gebruik te maken van zowel mannelijke, als vrouwelijke dieren in gelijke hoeveelheden.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om weefsels en organen op verschillende tijdpunten tijdens de infectie of na afloop te kunnen uitnemen voor verder onderzoek en/of om te voorkomen dat de zich verder ontwikkelende tumor ongerief zal gaan veroorzaken. Een deel van de dieren wordt gedood om weefsels te verkrijgen voor ex vivo onderzoek. In het algemeen acht de DEC het niet raadzaam om dieren die een ernstige infectie met een gevaarlijk micro-organisme hebben doorgemaakt in leven te laten. 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 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. Vrijwel alle dieren ondergaan een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit. Circa 4% van het totaal aantal dieren ondervindt ernstig ongerief (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. Uiteindelijk doel van het project is de eigenschappen van T-cellen zo beïnvloeden dat ze succesvol kunnen worden ingezet voor immunotherapie bij infecties en kanker. Dit onderzoek is in de eerste plaats fundamenteel van aard en richt zich op het verwerven van de kennis die daarvoor nodig is. Een verbetering van de mogelijkheden om ernstige infecties en kanker te behandelen, waardoor de patiënt uitzicht heeft op genezing of een langere overlevingstijd met een beter kwaliteit van leven, acht de DEC van groot belang.
3. De DEC is overtuigd van het grote belang van de doelstelling van dit project, namelijk het verwerven van inzichten die op termijn kunnen bijdragen aan het optimaliseren van immunotherapie. De commissie is daarnaast overtuigd van de kwaliteit van het onderzoek 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 hierboven geschetste grote belang van de doelstelling 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 het onderzoek 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 (art. 10a1, lid 3) dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

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.

Met vriendelijke groet,





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis

[Redacted]

Postbus 90203
1066 CX AMSTERDAM


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD3010020172205
Bijlagen
2

Datum 16 juni 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 14 juni 2017. Het gaat om uw project "Study of immune cells after infection and tumor challenge to uncover fundamental principles to improve immunotherapy". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD3010020172205. 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 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD3010020172205

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
16 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD3010020172205

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 30100

Naam instelling of organisatie: Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis

Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:

■■■■■■■■■■

KvK-nummer: 40530817

Straat en huisnummer: Plesmanlaan 121

Postbus: 90203

Postcode en plaats: 1066 CX AMSTERDAM

IBAN: NL71DEUT0626343534

Tenaamstelling van het rekeningnummer: Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■

Datum:
16 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD3010020172205

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor 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: 1 augustus 2017
Geplande einddatum: 1 augustus 2022
Titel project: Study of immune cells after infection and tumor challenge to uncover fundamental principles to improve immunotherapy
Titel niet-technische samenvatting: Studie aan immuun cellen na infectie en tumor challenge om fundamentele principes te ontrafelen voor immunotherapie
Naam DEC: NKI
Postadres DEC: [REDACTED] Postbus 90203;1006 BE; Amsterdam
E-mailadres DEC: [REDACTED]


Betaalgegevens

De leges bedragen: € 2.113,-
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: Amsterdam
Datum: 12 juni 2017

Datum:
16 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD3010020172205



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis

Postbus 90203

1066 CX AMSTERDAM



Centrale Commissie Dierproeven

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD3010020172205

Bijlagen

2

Datum 16 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 juni 2017

Vervaldatum: 16 juli 2017

Factuurnummer: 172205

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD3010020172205	€ 2.113,00

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 Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis

Postbus 90203

1066 CX AMSTERDAM



Centrale Commissie Dierproeven

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD3010020172205

Datum 29 juni 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 14 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Study of immune cells after infection and tumor challenge to uncover fundamental principles to improve immunotherapy" met aanvraagnummer AVD3010020172205. 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

In de NTS wordt gesproken over terminaal ongerief bij een deel van de dieren, wat niet terug te vinden is in het projectvoorstel en de bijlagen. Dieren die zonder voorafgaande handeling worden gedood dienen als "licht" geclassificeerd te worden. Graag dit aanpassen in de NTS.

Onduidelijkheden

De aanvrager zal nog de volgende vragen gesteld worden:

- In de NTS wordt gesproken over terminaal ongerief bij een deel van de dieren, wat niet terug te vinden is in het projectvoorstel en de bijlagen. Dieren die zonder voorafgaande handeling worden gedood dienen als "licht" geclassificeerd te worden. Graag dit aanpassen in de NTS.

- U beschrijft de zoektocht naar targets voor verbetering van T-cel immunotherapie. Kunt u aangeven aan welke criteria potentiële targets moeten voldoen alvorens u deze in vivo gaat testen? M.a.w. waarop baseert u

uw keuze voor de potentiële targets?

Datum:

29 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD3010020172205

- In bijlage 3.4.4.5 beschrijft u 20% (vraag B) tot 25% (vraag A) dieren die niet bruikbaar zijn door bijvoorbeeld geen tumortake. Welk percentage is correct? Indien nodig de dieraantallen hierop aanpassen (in aanvraag en NTS).

- In bijlage 3.4.4.5 beschrijft u niet of u mannelijke of vrouwelijke dieren gebruikt. Graag benoemen en indien niet beide geslachten gebruikt worden, onderbouw waarom. Als onvoldoende (wetenschapopelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht noodzakelijk is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

- U beschrijft in meerdere bijlagen het maken van bone marrow chimeric animals. Heeft u bij de inschatting van het aantal dieren dat u nodig heeft in dit project rekening gehouden met de donordieren voor het maken van deze chimeric animals?

- U heeft de ongeriefsinschatting van bijlage 3.4.4.6 op licht gezet. Heeft u bij de inschatting van het ongerief in bijlage 3.4.4.6 rekening gehouden met de gevolgen van de bestraling voor het maken van de BM-chimeren? De DEC heeft ons bevestigd dat het gebruik van beenmerg-chimeren zou leiden tot matig ongerief. Kunt u aangeven om hoeveel dieren het in deze bijlage gaat die dus matig ongerief zullen ondervinden?

Graag ontvangen wij aangepaste documenten.

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).

Datum:

29 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD3010020172205

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting

AVD3010020172205

Puntsgewijs antwoord van onderzoeker op vragen van de CCD:

- In de NTS wordt gesproken over terminaal ongerief bij een deel van de dieren, wat niet terug te vinden is in het projectvoorstel en de bijlagen. Dieren die zonder voorafgaande handeling worden gedood dienen als "licht" geclassificeerd te worden. Graag dit aanpassen in de NTS.

De wijziging is uitgevoerd zoals gevraagd. Zie hiervoor NTS onder punt 3.5 en de betreffende bijlage 1 onder punt K waar deze oorspronkelijk als terminaal en nu als mild geclassificeerde muizen op vermeld staan.

- U beschrijft de zoektocht naar targets voor verbetering van T-cel immunotherapie. Kunt u aangeven aan welke criteria potentiële targets moeten voldoen alvorens u deze in vivo gaat testen? M.a.w. waarop baseert u uw keuze voor de potentiële targets?

De potentiële targets worden geselecteerd op basis van de volgende overwegingen. De werking van T cel immunotherapie is afhankelijk van het verkrijgen van zoveel mogelijk van de meest geschikte T cellen met het meest geschikte gereedschap om geïnfecteerde cellen of tumorcellen op te ruimen. Potentiële targets worden dus gezocht in moleculen die een belangrijke rol spelen in de expansie, differentiatie en effector functie van T cellen. Dit is nu vermeld in de aanvraag. Zie hiervoor de project proposal onder punt 3.2.

- In bijlage 3.4.4.5 beschrijft u 20% (vraag B) tot 25% (vraag A) dieren die niet bruikbaar zijn door bijvoorbeeld geen tumortake. Welk percentage is correct? Indien nodig de dieraantallen hierop aanpassen (in aanvraag en NTS).

Het gedeelte van de experimentele muizen zonder tumor take moet zijn 25% en dat percentage is nu consistent aangehouden. Zie hiervoor bijlage 5 onder punt B en K en voor aanpassing in de aantallen van de NTS onder punt 3.5.

- In bijlage 3.4.4.5 beschrijft u niet of u mannelijke of vrouwelijke dieren gebruikt. Graag benoemen en indien niet beide geslachten gebruikt worden, onderbouw waarom. Als onvoldoende (wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht noodzakelijk is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Op basis van eerdere experimenten, verwachten we geen verschillen tussen mannen en vrouwen in de vermelde plannen. We zijn dus van plan om mannen en vrouwen door elkaar te gebruiken. In het geval van adoptieve transfer proeven (bv T cellen van een muis injecteren in een andere muis) zullen vanwege risico op afstoting strikt proeven worden gedaan met of alleen mannen of alleen vrouwen. We zullen dan ervoor zorgen dat er dan proeven met alleen mannen worden afgewisseld met proeven met alleen vrouwen. Dit is nu vermeld in de aanvraag. Zie hiervoor bijlage 5 onder punt B.

- U beschrijft in meerdere bijlagen het maken van bone marrow chimeric animals. Heeft u bij de inschatting van het aantal dieren dat u nodig heeft in dit

project rekening gehouden met de donordieren voor het maken van deze chimeric animals?

Deze dieren zijn opgenomen onder bijlage 6 waarin dieren zonder voorafgaande handelingen kunnen worden geofferd zoals het geval is voor de donor dieren voor het maken van chimere muizen. Dit is nu duidelijk vermeld. Zie hiervoor bijlage 6 onder punt A.

- U heeft de ongeriefsinschatting van bijlage 3.4.4.6 op licht gezet. Heeft u bij de inschatting van het ongerief in bijlage 3.4.4.6 rekening gehouden met de gevolgen van de bestraling voor het maken van de BM-chimeren? De DEC heeft ons bevestigd dat het gebruik van beenmerg-chimeren zou leiden tot matig ongerief. Kunt u aangeven om hoeveel dieren het in deze bijlage gaat die dus matig ongerief zullen ondervinden?

We verwachten 500 dieren te gebruiken als ontvangers voor BM-chimere proeven onder bijlage 6. Dit houdt dus in dat er 500 dieren zijn met matig ongerief vanwege de classificatie van het maken van chimere muizen dmv bestraling als matig ongerief. De aanpassing in de bijlage is gemaakt zoals gevraagd. Zie hiervoor bijlage 6 onder punt K en aanpassing van de aantallen in de NTS onder punt 3.5.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis

Postbus 90203

1066 CX AMSTERDAM



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD3010020172205
Bijlagen
1

Datum 18 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 14 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Study of immune cells after infection and tumor challenge to uncover fundamental principles to improve immunotherapy" met aanvraagnummer AVD3010020172205. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 4 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. In antwoord op onze vragen zijn de dieraantallen en de ongeriefsclassificatie in de NTS consistent gemaakt met die in het projectvoorstel, zijn de criteria waarop potentiële targets worden gekozen verhelderd, is het percentage tumortake verduidelijkt, is aangegeven van welk geslacht de dieren zullen worden gebruikt en is het ongerief voor de bone marrow chimeric animals meegewogen in bijlage 3.4.4.6.

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 "Study of immune cells after infection and tumor challenge to uncover fundamental principles to improve immunotherapy" 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 maximale looptijd van 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Datum:
18 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD3010020172205

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.

Beoordeling achteraf dient plaats te vinden wegens ernstig ongerief van een deel van de dieren.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie NKI gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 27 juni en 4 juli 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Naar aanleiding van een door ons gestelde vraag heeft de DEC de ongeriefsclassificatie in bijlage 3.4.4.6 bijgesteld van licht naar matig voor 5% van de dieren.

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

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

Bezwaar

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

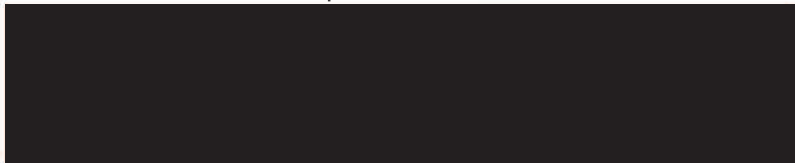
Datum:

18 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD3010020172205

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: Stichting Het Nederlands Kanker Instituut -
Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis

Adres: Postbus 90203

Postcode en plaats: 1066 CX AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 30100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Study of immune cells after infection and tumor challenge to uncover fundamental principles to improve immunotherapy" met aanvraagnummer AVD3010020172205, volgens advies van Dierexperimentencommissie NKI. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 14 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 4 juli 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 4 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 juni 2017, ontvangen op 14 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 4 juli 2017

Aanvraagnummer:
AVD3010020172205

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Breeding with discomfort				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	1.500	10% Matig 90% Licht	
3.4.4.2 Local infection with influenza				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	2.880	10% Ernstig 90% Matig	
3.4.4.3 Systemic infection with <i>Listeria monocytogenes</i> or LCMV				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	5.760	100% Matig	
3.4.4.4 Infection with acute and chronic LCMV				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	2.880	100% Matig	
3.4.4.5 Tumor challenge				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	2.200	38% Ernstig 38% Matig 25% Licht	
3.4.4.6 Homeostasis studies				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	10.000	5% Matig 95% Licht	

Aanvraagnummer:
AVD3010020172205

3.4.4.7 Immunization			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	2.880	100% 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 juli 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

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



Aanvraagnummer:

AVD3010020172205

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:
AVD3010020172205

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 W17-12										
nr.	document NTS 20172207	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel			x						
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x						
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x						
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x						
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x						
8	DEC-advies				x		x	x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
10	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
11	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
12	Adviesnota CCD		x							x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x		



Centrale Commissie Dierproeven

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 50100 <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	TNO
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	27376655
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	
		Postbus	96800
		Postcode en plaats	2509 JE DEN HAAG
		IBAN	NL39INGB0657819271
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	TNO
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] x Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Onderzoeker
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters

Dhr. Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag

Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

Nee > Ga verder met vraag 3

Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 01 - 01 - 2018

Einddatum 31 - 12 - 2023

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. *in vivo* fibrose modellen.

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces in diermodellen

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC DEC-TNO

Postadres 96800 2509 JE DEN HAAG

E-mailadres

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.
 s.v.p. uw factuur o.v.v. 'vooruitbetaling' en het bestelnummer 3100165835/1 indienen via e-mail bij [redacted] adres:
 TNO T.a.v. Accounts Payable
 Postbus 96829
 2509 JE DEN HAAG

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, ondertekenen 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 Den Haag

Datum 18-06-2017

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.
- 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.

Fibrose is een pathologisch proces waarbij een overmatige vorming van fibreus bindweefsel in organen of weefsels optreedt. Fibrose kan gezien worden als een uit de hand gelopen wondhelingsproces, waarbij er een dusdanig zeer sterke ophoping van bindweefsel kan optreden dat het normaal functioneren van het orgaan niet meer mogelijk is. Hierdoor kan fibrose tot ernstige gezondheidsproblemen leiden en heeft levensbedreigende aspecten als het bijvoorbeeld de long, lever of nier betreft. Hoewel de klinische noodzaak om fibrose te kunnen behandelen overduidelijk is (er wordt geschat dat in 45% van alle sterfgevallen fibrose een rol heeft gespeeld) waren er tot enkele jaren geleden geen behandelmethoden beschikbaar.

Met het op de markt komen van twee (zij het nog maar zeer matig effectieve) medicijnen tegen longfibrose (Pirfenidone door Roche en Nintedanib door Boehringer Ingelheim) is het fibrose onderzoek de afgelopen jaren in een enorme stroomversnelling geraakt. Zowel binnen de farmaceutische industrie als binnen de academia worden momenteel nieuwe medicijnen ontwikkeld die de hoop bieden dat binnen afzienbare tijd nieuwe therapiemogelijkheden beschikbaar komen. Dit wordt ondersteund door het feit dat hoewel er grote verschillen tussen de organen kunnen zijn in factoren die fibrose kunnen veroorzaken, er een grote overlap in de processen is als het fibroseproces eenmaal op gang is. Dit betekent dat bijvoorbeeld een therapie die ontwikkeld is voor de behandeling van longfibrose vaak ook effect in andere orgaanfibroses kan hebben.

Een essentiële stap in het testen van nieuwe farmaca is het aantonen van effectiviteit in een preklinische setting voordat ze in een klinische fase verder getest zullen gaan worden. TNO heeft de afgelopen 15 jaar een breed portfolio van *in-vivo* en *in-vitro* modellen ontwikkeld waarin we fibrose in verschillende organen kunnen nabootsen. Middels ons portfolio ondersteunen wij zowel de farmaceutische industrie als de academische wereld bij het zo goed mogelijk testen van nieuwe therapie mogelijkheden. Omdat het onderzoek naar nieuwe anti-fibrotische therapieën nog een relatief jong onderzoeksveld is, vinden er voortdurend verbeteringen aan modellen en uitleesmogelijkheden plaats. Wij streven ernaar om deze zo goed mogelijk in ons portfolio te incorporeren om daarmee een zo optimaal mogelijk preklinisch palet aan te bieden.

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 hoofddoel van dit project is het testen van nieuwe anti-fibrotische therapie mogelijkheden in state-of-the-art long-, huid-, lever en/of nier fibrosemodellen die zo goed mogelijk bijdragen aan het voorspellen van de uiteindelijke klinische effectiviteit.

Om dit mogelijk te maken zijn de volgende subdoelen in dit project geïntegreerd:

- Continue validatie en verdere optimalisatie van de modellen (bijvoorbeeld door het toevoegen van extra read-out mogelijkheden, het uittesten van nieuwe toedieningsstrategieën, het ontwikkelen van meer chronische varianten van onze modellen om daarmee de humane klinische situatie beter te benaderen en het uittesten van potentiële nieuwe positieve controles).
- Ontwikkelen van kennis over het fibrotische proces in de verschillende modellen (bijvoorbeeld het volgen van de fibroseontwikkeling in de tijd of het vergelijken van fibrotische processen tussen dier en mens om daarmee optimale translatie mogelijk te maken).

Dit project heeft een hoge haalbaarheid:

TNO heeft een zeer uitgebreid track record op dit gebied. Onderzoekers binnen de groep zijn al meer dan 20 jaar werkzaam op het gebied van extracellulaire matrix aanmaak en afbraak. Daarnaast heeft TNO sinds 10 jaar een uitgebreid programma op het onderzoeken en testen van nieuwe anti-fibrotische

therapie mogelijkheden. Hierbij is een groot netwerk binnen zowel de academische wereld als binnen de farmaceutische industrie opgebouwd. Binnen dit netwerk hebben we de afgelopen 10 jaar meer dan 50 samenwerkingsprojecten (zowel bilateraal als in grotere consortia) uitgevoerd.

3.3 Belang

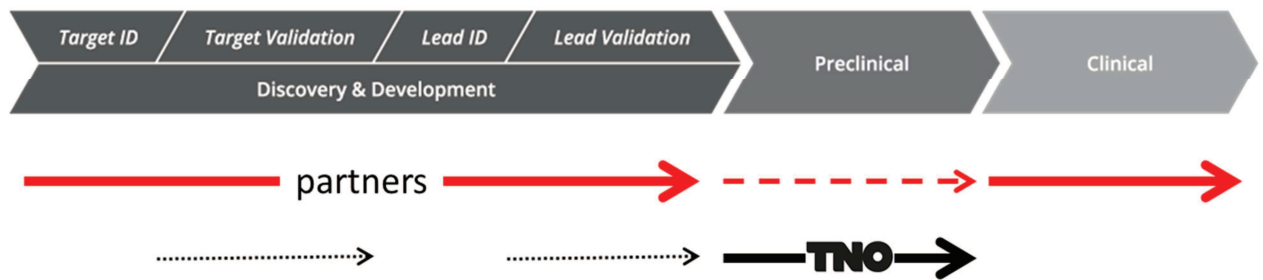
Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Er is géén therapie beschikbaar ter voorkoming van fibrose, terwijl de behandeling met de momenteel beschikbare farmaca slechts matig effectief is in zowel de patiënt als in de muis. Fibrose is een chronische aandoening die tot ernstige gezondheidsproblemen kan leiden en heeft levensbedreigende aspecten als het de long, lever of nier betreft. Hoewel de klinische noodzaak om fibrose te kunnen behandelen overduidelijk is (45% van alle mortaliteit heeft een fibrotische component) zijn er nog nauwelijks goede behandelmethoden beschikbaar. Bovenstaande doelstellingen zullen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen tegen fibrose. Deze zullen leiden tot een aanzienlijke verbetering en verhoging van de kwaliteit van leven, enorme kostenbesparing in de zorg en meer arbeidsparticipatie van fibrosepatiënten. Om dit mogelijk te maken is het essentieel dat de bestaande wetenschappelijke kennis over het ontstaan van fibrose en de daarvoor verantwoordelijke processen verder uit te breiden. Longfibrose wordt gekenmerkt door kortademigheid, infiltraten (te zien op röntgenfoto) en ontsteking/fibrosis. Als de longfunctie vermindert neemt de sterfte toe. 50-70% van de patiënten met longfibrose sterft binnen 5 jaar na de diagnose. Per jaar worden 12 op de 100.000 mensen gediagnostiseerd met idiopathische longfibrose. Leverfibrose wordt vaak gezien in obese of hepatitis B of C besmette patiënten. Het duurt jaren voordat de ziekte zich ontwikkelt en klinische signalen worden herkend. 10 tot 20% van alle patiënten gediagnostiseerd met leverfibrose zullen uiteindelijk sterven aan cirrose of leverkanker als er niet wordt overgegaan op een levertransplantatie. Bij 25% van de hepatitis geïnfekteerde patiënten met een levertransplantatie keert de fibrose/cirrose weer terug. Wereldwijd lijden 400 miljoen mensen aan leverfibrose. Chronisch nierfalen kan ontstaan door meerdere oorzaken, zoals diabetes of hypertensie. Eén van de kenmerken van eindstadium nierfalen is de ontwikkeling van fibrose in de verschillende compartimenten in de nier. Wanneer de nier is beschadigd, ontstaat een ontsteking die zich kan ontwikkelen tot 'end stage' nierfibrose. De ontstane nefropathie veroorzaakt veel sterfte binnen de diabetes en obese patiënten populatie. Er is geen goede therapie voor nierfalen en de enige behandeling die op dit moment werkt is dialyse of niertransplantatie. Helaas is dit geen lange termijn oplossing. Geschat wordt dat in 2020 drie miljoen Nederlanders diabetes hebben, 44% van deze patiënten zal nefropathie en leverpathologie ontwikkelen. Ook huidfibrose (bijvoorbeeld in het ziektebeeld systemische sclerodermie of na verbranding) kan leiden tot ernstige gezondheidsproblemen. In handen en gezicht komt deze ziekte het meest voor. Samentrekking van bindweefsel kan daar leiden tot een sterk verlies van functie in de hand en de mond.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het ontwikkelen van nieuwe therapeutica verloopt volgens een vast stramien:



Allereerst worden er geschikte targets geïdentificeerd op basis van bijvoorbeeld literatuur, humane studies en/of *in vitro* testen. Vervolgens wordt gevalideerd of modificatie van het target inderdaad tot verandering van pathologie kan leiden (bv *in vitro* testen, *ex vivo* testen met humaan weefsel, *in vivo* testen in transgene dieren). Hierna worden stoffen (leads) ontwikkeld die het target kunnen beïnvloeden (bv remmende antilichamen, small molecules, RNA therapie) en worden deze leads gevalideerd (welke stof is het meest potent, hoe is de oplosbaarheid, hoe specifiek is de stof). De meest veelbelovende kandidaten gaan vervolgens door naar de preklinische testfase, waarin wordt onderzocht of de kandidaat stoffen goed genoeg zijn om in de mens getest te worden (klinische fase). Het ultieme doel hierbij is natuurlijk dat stoffen die ook de klinische fase met succes doorlopen als nieuwe therapie zullen worden toegelaten.

TNO ondersteunt als Research and Technology Organization (RTO) al jaren zowel de farmaceutische industrie als academische partners bij het uitvoeren en optimaliseren van preklinisch onderzoek op het gebied van fibrose. Omdat het uitvoeren van dit soort onderzoek bij TNO goed gevalideerd is en het vaak om specialistische modellen gaat, kiezen veel partners ervoor dit soort onderzoek in samenwerking te doen in plaats van zelf uit te voeren. Belangrijk hierbij is te realiseren dat het voor partners vaak van even groot belang is om te leren dat een stof niet werkt (en dus niet door kan naar de klinische fase) als om aan te tonen dat een stof wel werkt. Het overgrote deel van het werk onder dit project valt in de preklinische fase, maar werk op het gebied van target validatie (bv aantonen dat een pathway betrokken is in fibrose d.m.v. het gebruik van transgene dieren) of lead validation (bv vergelijken van verschillende varianten van een nieuwe stof om daarna te kunnen kiezen welke stof verder ontwikkeld zal worden) vindt ook plaats.

Voor het testen van nieuwe geneesmiddelen die de fibrosevorming verminderen, maken wij gebruik van 4 diersmodellen. Uit uitgebreide literatuurstudie en na intensieve consultatie met farmaceutische partijen en academische partners is naar voren gekomen dat deze modellen op dit moment het best gevalideerd en geaccepteerd zijn (ook door de FDA) voor het preklinisch testen van nieuwe therapie mogelijkheden. Het betreft hier de volgende modellen:

- Bleomycine-geïnduceerde longfibrose
- Bleomycine-geïnduceerde huidfibrose
- CCl₄-geïnduceerde leverfibrose
- Ureter obstructie geïnduceerde nierfibrose

Het overgrote deel (>80%) van de studies die onder deze projectaanvraag zullen worden uitgevoerd zullen effectiviteit studies zijn waarin nieuwe therapeutica worden getest. Dit zal in samenwerking met of in opdracht van externe partners plaatsvinden. Voor elke individuele studie wordt uitgebreid met de betreffende partner overlegd over het optimale studiedesign. Er wordt altijd aan de partner gevraagd wat er al bekend is van het te testen middel, om zo onnodig proefdier gebruik te voorkomen. TNO heeft voor verschillende modellen uitgebreide datasets beschikbaar waarin kan worden gekeken of de targets inderdaad betrokken zijn. Verder komen hierbij ook aspecten als keuze van het meest geschikte model (meestal gebaseerd op het werkingsmechanisme of het toepassingsgebied), de experimentele opzet, de toedieningsroute, de behandelingsfrequentie, de poweranalyse, de concentratie keuze, de uitleesparameters, etc. aan de orde.

Hoewel bovenstaande modellen op dit moment het meest geschikt geacht worden voor het testen van nieuwe therapie mogelijkheden betekent dit niet dat er geen knelpunten binnen het fibrose onderzoek meer zijn. Daarom zullen de resterende studies die onder deze projectaanvraag zullen worden uitgevoerd zich richten op het continue verder verbeteren van deze modellen. De hoofdknelpunten waar we op ons zullen

richten zijn:

- Verbeteren reproduceerbaarheid en verbeteren validatie van de modellen: in de uitgebreide literatuur over deze modellen worden veel varianten gebruikt die niet allemaal gelijkwaardig zijn. In het verleden hebben we de reproduceerbaarheid van het longfibrose model al sterk kunnen verbeteren door de toedieningsroute van bleomycine te veranderen van intratracheale injectie naar oropharyngeale toediening. We proberen continue de modellen te verbeteren en tegelijkertijd de modellen zo goed mogelijk te valideren. Hier zal onder andere ook worden gekeken of het mogelijk is om verschillende modellen te combineren (inductie van longfibrose in het huidfibrosemodel), zodat er meer kennis met minder dieren kan worden gegenereerd.
- Verbeteren van beschikbare uitleesparameters: veel van de klassieke uitleesparameters zijn gericht op het meten van het collageen eiwit (histologie, biochemische analyses). Deze hebben als nadeel dat ze vaak weinig onderscheidend zijn (de therapie werkt/werkt niet). Wij richten ons daarom ook op meer gevoelige methodes die de processen beter in kaart kunnen brengen (bijvoorbeeld -omics benaderingen). Hiermee hopen we in de toekomst verschillen tussen nieuwe therapiemogelijkheden beter te kunnen differentiëren. Daarnaast heeft het ontwikkelen van nieuwe uitleesparameters die het beter kunnen bepalen van werkzaamheid in een therapeutisch behandelprotocol kunnen versterken. In het verleden hebben we hier al stappen kunnen zetten door het toepassen van zwaar water labeling van nieuw collageen.
- Verbeteren van kennis over het fibroseproces in muis en rat en het vergelijken van deze processen met het humane ziektebeeld. Deze kennis zal gebruikt worden om beter te kunnen onderzoeken wat de overlap en de verschillen tussen de model ziekte en het humane ziekteproces te kunnen bepalen. Hiermee zal een verbeterde translatie naar de kliniek kunnen plaatsvinden. Daarnaast zal deze kennis worden gebruikt om beter advies te kunnen geven over de opzet van de proeven. Zo zal bijvoorbeeld meer gedetailleerde kennis over het tijdsverloop van de modellen kunnen bijdragen aan een beter ontwerp van een therapeutisch regime (bv bepalen wat het optimale moment om te starten van een behandeling gebaseerd op kennis van het werkingsmechanisme van de nieuwe therapie).

Bij vraag D van de verschillende bijlagen zijn voorbeeldstudies gegeven om duidelijker te maken op welk gebied deze verbeteringen kunnen liggen.

Alle studies worden uitgevoerd conform de richtlijnen van de "good practice guide" (van Diehl *et al*, J Appl Toxicol. 2001 Jan-Feb;21(1):15-23.) en worden voor aanvang eerst door de IvD getoetst.

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

1) Testen van nieuwe anti-fibrotische therapieën

Binnen ons netwerk (farmaceutische industrie, academische partners) worden veel nieuwe behandel mogelijkheden voor fibrotische aandoeningen ontwikkeld. Veel van onze partners hebben zelf niet de kennis/capaciteit in huis om deze nieuwe therapieën op effectiviteit te testen en maken gebruik van onze expertise om deze testen uit te voeren. Therapieën die worden ontwikkeld zijn o.a. small molecules, antilichamen, celtherapie, antisense technologieën. Daarnaast kan bijvoorbeeld het belang van een bepaalde pathway worden onderzocht door gebruik te maken van transgene dieren, dit kan vooral van belang zijn als er nog geen andere mogelijkheden zijn om deze pathways te moduleren.

2) Instandhouding lopende diermodellen

De batches bleomycine die wij gebruiken voor het induceren van huid of longfibrose hebben een verschillende werkzaamheid. Dit betekent dat bij elke nieuwe batch bepaald moet worden bij welke concentratie het fibrose inductie window voldoende hoog is. Voor de huid en longfibrose modellen worden verschillende batches gebruikt. De gevoeligheid varieert ook per species en potentieel per stam. Afhankelijk van het aantal daadwerkelijk uitgevoerde studies zal er naar schatting elke 3 jaar een nieuwe batch getest moeten worden.

3) Verbetering modellen/read-outs

Op basis van contacten binnen ons uitgebreide netwerk, de nieuwste literatuur en ons eigen programma gericht op het continu aanbrengen van verbetering in de modellen, zal er steeds worden gestreefd met zo min mogelijk dieren en zo min mogelijk ongerief maximaal inzicht te krijgen in het ontwikkelen van nieuwe therapieën.

Hierbij zullen onder andere de volgende vragen worden geadresseerd:

- Is het mogelijk de milde longfibrose die in het huidfibrose model optreedt meer consistent tot expressie te laten komen zodat beide pathologieën in hetzelfde model kunnen worden onderzocht? (Zodat niet twee afzonderlijke modellen hoeven worden uitgevoerd, dit geeft vermindering van aantallen dieren in studies).
- Is het mogelijk het transiënte fibroseproces in het longfibrose model met behulp van meerdere inductiemomenten meer de humane ontwikkeling te laten doormaken? Zo ontstaat een meer chronisch dan acuut longschade model, dit is beter transleerbaar naar de kliniek.
- Verfijning van toedieningsmogelijkheden. Bijvoorbeeld de manier van het induceren van de fibrose, of het systemisch toedienen van therapeutica.

4) Verdere ontwikkeling kennis over modellen

Meer beschikbare kennis over de modellen draagt bij aan het optimaliseren van het studiedesign voor het testen van nieuwe therapeutica.

Voorbeelden hiervan zijn:

* Bepaling van werkzaamheid van erkende referentiestoffen

* Het maken van een transcriptoom database door de tijd heen; hierin kunnen partners voordat ze een dierstudie gaan inzetten controleren of hun nieuwe targets wel in de modellen voorkomen: dit geeft uiteindelijk vermindering van het aantal dierproeven.

* Ontwikkelen van meer kennis over eventuele herstelprocessen die plaatsvinden na fibrose inductie; dit geeft meer inzicht of het mogelijk is om fibrose daadwerkelijk te genezen ipv de verdere ontwikkeling te remmen.

* Hoe is het microbioom betrokken bij de ziekte?

* biomarkers zoeken in plasma die voorspellend zijn voor de mate van fibrosevorming

*Vergelijking van de gegeneerde data uit de diermodellen met humane longfibrose patiënt gegevens, om zo de voorspelbaarheid vanuit de modellen naar de kliniek te optimaliseren.

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.

Alle onderdelen van deze projectaanvraag zijn erop gericht om zo optimaal mogelijk (maximale voorspelbaarheid naar de kliniek gecombineerd met minimaal proefdiergebruik) te beoordelen of nieuwe therapieën preklinische effectiviteit laten zien en daarmee geschikt zijn voor verdere klinische ontwikkeling. Hierbij wordt gebruik gemaakt van vier verschillende diermodellen voor fibrose die tezamen het overgrote deel van de humane klinische ontwikkelingsgebieden afdekken.

Door een proces van voortschrijdende validatie en verdere doorontwikkeling wordt ernaar gestreefd om te allen tijde de best mogelijke studiedesigns te kunnen aanbieden.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Longfibrose in muis of rat
2	Nierfibrose in muis of rat
3	Huidfibrose in muis of rat
4	Leverfibrose in muis of rat
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 |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="text" value="3.4.4.1"/> | <input type="text" value="Longfibrose in muis of 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.

Er is op dit moment geen goede therapie beschikbaar ter voorkoming of behandeling van longfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe anti-fibrotica maken wij gebruik van het bleomycine-geïnduceerde longfibrosemodel in muis of rat. Dit is wereldwijd het meest gebruikte model gericht op het testen van nieuwe therapieën op het gebied van longfibrose.

Om longfibrose te induceren krijgen de dieren op dag 0 onder een isofluraan roesje oropharyngeaal (op de stembanden) een bleomycine oplossing gedruppeld. Uit studies met als doel verbetering van de modellen is gebleken dat deze wijze van toediening minder ongerief veroorzaakt dan intratracheale toediening, terwijl de verdeling van de bleomycine over de longen homogener is waardoor het model beter reproduceerbaar en minder variabel qua ziektelast is geworden.

Aan het preklinisch testen van nieuwe therapeutica gaat altijd een groot traject vooraf (zie 3.4 projectvoorstel). Op grond van de kennis uit dat traject zal in overleg met de partner een gedetailleerd studieplan worden opgesteld. Dit omvat o.a. de rationale voor het testen van de stof in een *in vivo* model en het werkingsmechanisme van de stof. Verder zullen in het studieplan de volgende aspecten worden vastgelegd (afhankelijk van de specifieke vraagstelling; deze zal per studie variëren):

- welke diersoort (muis / rat), geslacht (man / vrouw), stam (bijvoorbeeld C57Bl6/J of een transgene variant)
- beschrijving van de te testen stoffen, inclusief de te gebruiken concentratie(s)
- het tijdstip van start behandeling (preventief of therapeutisch)
- route van toediening
- frequentie van toediening (variërend van eenmalig tot tweemaal daags)
- experimentduur 21 dagen, maar indien we het model chronisch laten verlopen zal de totale studieduur met 3 weken worden verlengd tot 42 dagen. De looptijd zal per studie aan de IvD worden onderbouwd.

- noodzaak voor tussentijdse bloedafname voor bijvoorbeeld een PK analyse.

Een voorbeeld van een veel gebruikt studie design voor het testen van nieuwe therapieën ziet er als volgt uit:

Voorbeeld long fibrose studie - testen van een compound:

					days:																					
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Group	Induction	Treatment	Route	dose	n																					
1	PBS	Controle vehikel	PO;QD	-	7									↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
2	Bleomycine	Controle vehikel	PO;QD	-	12									↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
3	Bleomycine	Compound 1	PO;QD	0.3 mg/kg	12									↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
4	Bleomycine	Compound 1	PO;QD	1 mg/kg	12									↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
5	Bleomycine	Compound 1	PO;QD	3 mg/kg	12									↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Fibrose inductie (OP bleomycine)						x																				
lichaamsgewicht (3x per week)					x		x		x				x		x		x			x		x		x		x
D2O administration (IP bolus)													x													
D2O administration (in drink water)													x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Euthanasie + isolatie plasma & long weefsels																										x

Een voorbeeld van een studie design voor het ontwikkelen van een meer chronisch longfibrose model:

Voorbeeld long fibrose studie - model ontwikkeling:

				days:																																														
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35											
Group	Induction	n																																																
1	PBS	10		x																																														
2	1x Bleomycine	15		x																																														
3	2x Bleomycine	15		x				x																																										
4	3x Bleomycine	15		x				x																																										
Fibrose inductie (OP PBS or bleomycine)				x				x																																										
lichaamsgewicht (3x per week)				x	x	x		x	x	x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Euthanasie (3 weken na laatste inductie) + isolatie plasma & weefsels																																																		

De primaire uitleesparameters voor deze studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de long m.b.v. histologische analyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de long als maat voor de mate van verbindweefseling (biochemische analyse).

Daarnaast kan, afhankelijk van de exacte vraagstelling, een groot aantal additionele parameters bepaald worden. Voorbeelden zijn: nat gewicht van de longen, bepalingen in long lavage vloeistof en/of serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse mbv gedeuterend water (D₂O) inbouw, etc.

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.

In de muis en rat wordt longfibrose geïnduceerd door bleomycine opgelost in PBS tijdens de isofluraan inhalatie narcose op de stembanden te druppelen (volume 50-200µl). Door de tong goed te fixeren en de neus dicht te houden wordt het slikreflex onderdrukt en het dieper inademen gestimuleerd (=oropharyngeaal methode). Gedurende de eerste 9-10 dagen na bleomycine inductie neemt het lichaamsgewicht langzaam af tot ca 85% van het startgewicht (ontstekingsfase). Na deze periode herstelt het gewicht zich weer tot het startgewicht.

Afhankelijk van de vraagstelling van de klant zal een behandelstrategie van de uit te testen compound worden opgesteld, deze zal per studie variëren. Mogelijke variaties zijn:

- het tijdstip van de behandeling (profy lactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal drie weken, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- route en frequentie van compound toediening (waaronder inhalatie, oraal, intra-nasaal, intra-tracheaal, intra-peritoneaal, intraveneus, subcutaan, via osmotische pompjes, sublinguaal of intramusculair).
- tussentijdse bloedafname voor bv PK analyse (Het maximaal af te nemen volume wordt gehandhaafd volgens de 'good practice' guideline van Diehl *et al.*)
- lichaamsgewicht bepaling als maat voor welzijn (2 of 3x per week standaard, maar bij gewichtsafname ook dagelijks). Bij ernstig gewichtsverlies (>25%) of als de dieren ademhalingsproblemen hebben en slecht reageren op externe prikkels zullen de dieren voortijdig uit experiment worden genomen.
- toediening van labels/tracers via intraperitoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water (D₂O) of BrdU).
- non-invasieve (in house) imaging (bijvoorbeeld schade vaststellen aan orgaan met een µCT scan of EchoMRI)
- korte of langere tijd (maximaal 5 uur) vasten voor isoleren van bloed of urine

- euthanasie methode (bv mbv gradual fill CO₂ of isofluraan of conform een andere geaccepteerde methode uit richtlijn 2010/63/EU, bijlage IV.) waarna isolatie van bloed, longvloeistof en longen zal plaatsvinden om de primaire uitleesparameters van de studie te kunnen analyseren.

Het injectievolume van de test compound(s) of tracers zal variëren tussen 5 en 10 ml/kg, maar uiterlijk de maximale verdraagbare dosis per injectieplaats zoals staat vermeld in de 'good practice' guideline van Diehl *et al.*

Details van de studie worden beschreven in het studieplan en voorafgaand aan de studie met de IvD afgestemd.

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

Voor elk studieplan zal een separate power analyse worden uitgevoerd om tot een zo accuraat mogelijke bepaling van het aantal benodigde dieren te komen. Hierbij worden onder andere de volgende gegevens gebruikt:

- Meest recente inschatting van de variatie binnen het model (model vertoont lichte variatie in de tijd)
- Exacte looptijd van experiment (fibrosevorming is tijdsafhankelijk)
- Primaire uitleesparameter (gevoeligheid van de verschillende variabelen is verschillend)
- Gewenste mate van gevoeligheid
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de bleomycine controle groep wordt vergeleken kan beter met ongelijke groepsgroottes worden gewerkt)

Als voorbeeld: gebaseerd op een power analyse met $\alpha = 0.05$ en $1-\beta < 0.80$ voor de detectie van een significante vermindering in collageen van 45% is een groepsgrootte van 13 dieren noodzakelijk (als alle groepen met elkaar vergeleken worden).

We houden er rekening mee dat per groep 1 tot 2 dieren voortijdig uit experiment moeten worden gehaald door ernstig gewichtsverlies of andere ernstige klinische verschijnselen gerelateerd aan de longfibrose ontwikkeling. Dit brengt de groepsgrootte naar 15 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de negatieve controle groep verwachten (saline geïnduceerde en vehikel behandelde groep) en deze groep voornamelijk wordt gebruikt om de mate van inductie te bepalen zijn hier minder dieren noodzakelijk, te weten 6-8.

In deze studie rekenen we met een power van 0.80. Soms wordt in overleg met de klant besloten om de power te verhogen naar 0.90. Het hanteren van een hogere power geeft een grotere kans weer dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad benaderd.

Wanneer het aantal dieren per groep afwijkt van de hierboven beschreven standaard zal de berekening aan de IvD in het afzonderlijke studieplan worden voorgelegd.

B. De dieren

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

Voor het bleomycine-geïnduceerde longfibrose muismodel worden voornamelijk mannelijke C57BL/6J muizen gebruikt in leeftijd van 8-12 weken oud. Vrouwelijke C57Bl/6J muizen ontwikkelen minder longfibrose bij dezelfde bleomycine dosis dan mannelijke dieren (uit eigen studies en discussies met partners bekend). Er wordt momenteel onderzocht of de mate van longfibrose in vrouwen verhoogd kan worden door een hogere dosis bleomycine zonder dat dit tot toegenomen sterfte leidt.

Het rat model is in vrouwelijke Wistar ratten (8-10 weken oud) gevalideerd. Indien de voorkeur naar mannetjes uit gaat, zal dit model eerst verder in mannen gevalideerd moeten worden. De meeste studies zullen in de muis worden uitgevoerd. Redenen om voor het ratmodel te kiezen zijn o.a. verschillen in werkzaamheid van de therapeutica tussen de species (bv species specifieke antilichamen, verschillen in metabolisme van de compound tussen de species), maar ook beschikbaarheid van data in 1 van de species (het hele voortraject incl. Pk studies is in rat uitgevoerd).

Indien een andere muis of rat stam nodig is zal dit in het studieplan aan de IvD worden onderbouwd.

Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal dieren per groep en het aantal groepen. Het aantal groepen in een studie wordt in samenspraak met de klant bepaald door de voorliggende vraagstelling en de groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de power analyse van het te verwachten

effect. Details worden voorafgaand aan de studie afgestemd met de IvD.

Gebaseerd op een verwacht aantal longfibrose studies van 10-12 per jaar met max 100 muizen per studie wordt het aantal benodigde muizen op maximaal 6000 geschat voor een periode van 5 jaar (12 studies x max. 100 dieren/studie x 5 jaar). De aanvraag voor rat longfibrose studies ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een studie omvat 60-100 ratten per studie, voor een periode van 5 jaar schatten we 1000 ratten nodig te hebben.

NB de ervaring leert dat er over de jaren variatie kan plaatsvinden m.b.t. welke fibrose modellen het meest toegepast worden. Dit betekent dat het maximale aantal dieren dat onder deze aanvraag gebruikt zal worden naar verwachting aanmerkelijk lager zal liggen dan een simpele optelsom van de aantallen vermeld in de vier bijlagen bij deze projectaanvraag doet vermoeden.

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 medicijnen die in onze longfibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de partner plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn er in de afgelopen decennia grote stappen gemaakt in het vervangen van *in vivo* studies door *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Echter voor de laatste stap, voordat het klinische programma gestart kan worden, is preklinisch testen in dieren tot nu toe nog noodzakelijk.

Vermindering:

Door optimalisaties van het model proberen we bij te dragen aan vermindering van het aantal benodigde dieren. Zo hebben we in het verleden de fibrose inductie al gewijzigd van intra-tracheaal naar oropharyngeaal. Hierdoor werd de variatie van de uitleesparameters verminderd en kon de groepsgrootte verkleind worden. Verder hebben we voor dit model uitgebreide mRNA datasets beschikbaar waardoor tevoren al kan worden gekeken of bepaalde pathways relevant zijn voor dit model.

Verfijning:

De dierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd studieprotocol, de medewerkers op deze studies zijn zeer ervaren en goed getraind. Hierdoor heeft de studie een maximale kwaliteit en wordt stress en ongemak voor de dieren zo laag mogelijk gehouden. De fibrose ontwikkeling kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. Dagelijks wordt dan ook de algehele gezondheidstoestand gecontroleerd. Bij verminderd welzijn van de dieren (als het ongerief meer dan matig wordt) zullen de dieren voortijdig uit de studie worden genomen.

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

Om angst en pijn voor de dieren zo veel mogelijk te beperken, zal de inductie van longfibrose onder anesthesie plaatsvinden. Verder worden alle werkzaamheden per studie door een gering aantal goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectievloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Bij het plaatsen van bv een osmotisch pompje onder de huid of in de buik, krijgt het dier altijd pre- en postoperatief pijnbestrijding toegediend.

Het welzijn van de dieren wordt dagelijks objectief beoordeeld door verschillende personen. Indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief optreden, zullen de dieren geëuthanaseerd worden. Om uiteindelijk over te gaan tot een humaan eindpunt, hebben wij een scoresysteem opgesteld waarop de dieren getoetst worden. Dit zal het geval zijn als de dieren niet meer eten of drinken, hierdoor ernstig gewicht verliezen (> 25%), slecht reageren op prikkels en/of ademhalingsproblemen hebben (zie J).
De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu. Afvalmateriaal uit de dierstudie (o.a. dierlijk weefsel, gecontamineerd beddingmateriaal of de bleomycine oplossing) wordt na afloop zorgvuldig gescheiden van het huishoudelijk afval en op juiste wijze afgevoerd.

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. dit is geen wettelijk vereist onderzoek

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.

Voor het induceren van longfibrose zullen de dieren onder een roesje van isofluraan gebracht worden, dit is om te zorgen dat de dieren stilliggen en goed de bleomycine oplossing zullen inademen. Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal wordt uitgevoerd onder een pre- en postoperatief pijnstillingsregiem (volgens wettelijk geldende richtlijnen).

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

nvt

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

nvt

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

nvt

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In het longfibrose model is het de bedoeling dat de dieren fibrose in de longen zullen ontwikkelen.

Doordat bleomycine schade aanbrengt aan het longepitheel zal hier op lokale plekken ontsteking plaatsvinden, vooral in de eerste 7 dagen na toediening. Immune cellen die naar de ontsteking toe migreren proberen de schade te herstellen. Echter, er zal ook functioneel longweefsel verloren gaan (hier ontstaan fibrosehaarden). Doordat het longweefsel deels niet meer functioneel is, kunnen de dieren het benauwd krijgen. De mate van het ontwikkelen van de fibrosehaarden en de daarmee gepaarde benauwdheid varieert tussen de dieren. Sommige dieren ontwikkelen meer fibrose dan anderen. Daarom hebben we een scoresysteem opgesteld waarop de dieren dagelijks getoetst worden zodat de dieren zo min mogelijk onnodig zullen lijden. Als de score groter is dan 2 worden de dieren geëuthanaseerd. De dieren worden drie keer per week beoordeeld op lichaamsgewicht. Dagelijkse controle van lichaamsgewicht en algehele gezondheidstoestand vindt plaats bij dieren die gewicht verliezen. In de eerste 8-10 dagen na de inductie van de ziekte (ontstekingsfase in de longen) vallen de dieren allemaal een beetje af (5-10%). Sommige dieren vallen echter in deze periode veel meer af. Als het gewicht van deze dieren in de eerste 10 dagen van de studie met 25% afneemt hebben we in het verleden gezien dat er in deze dieren geen verbetering meer zal optreden. We besluiten dan ook om dan het humane eindpunt uit te oefenen.

Treedt het gewichtsverlies pas na dag 7, en meer geleidelijk op, dan weten we dat het dier zich zal stabiliseren en dat we de dieren in experiment kunnen laten.

Als naast het gewichtsverlies de dieren ook aanhoudend trillen, niet reageren op prikkels, ademhalingsproblemen hebben, of een vacht met opstaande haren dan wordt ook toch overgegaan op het uitvoeren van het humane eindpunt. Hieronder staat ons humane eindpunt formulier weergegeven. Dit formulier gebruiken we in alle fibrose studies.

Algemene humane eindpunten formulier:

Dieren dienen te worden geëuthanaseerd indien een **score van 2 of groter** van onderstaande criteria in het experiment gesignaleerd worden:

Ongeriefcode

- A** Aanzienlijke gewichtsafname een aantal dagen achtereen (1)
- B** Abnormaal gedrag bijvoorbeeld:
 - B1** - benauwdheid/hijgen (1)
 - B2** - speekselvoed (1)
 - B3** - minder / niet reageren op prikkels (2)
 - B4** - aanhoudend trillen (2)
 - B5** - aanhoudend stuip trekken (2)
 - B6** - zelfverminking (2)
- C** Omhoog staan van de haren (1)
- D** Abnormale houding (1)

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

Uit historische data van studies zien we dat gemiddeld tussen 5 tot 10% van de dieren voortijdig uit studie worden genomen omdat het ongerief hoger dan matig wordt.

K. Classificatie van ongerief

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

Onze negatieve controle groep zal licht ongerief ondervinden, deze groep ontwikkelt geen ziekteverschijnselen. De bleomycine-geïnduceerde groepen zullen maximaal matig ongerief ondervinden en de compound behandelde groepen zullen naar verwachting licht tot matig ongerief ondervinden, omdat de compound mogelijk de fibrosevorming vermindert. Echter, het komt voor (in 0.5-1% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief omdat er meer dan matige longfibrose is ontstaan) dat dieren acuut verslechteren en we dit niet zagen aankomen. Dieren overlijden dan 's nachts en worden de volgende dag dood in de kooi aangetroffen. De experimentduur van onze modellen varieert van 1 tot enkele weken waarin de dieren maximaal een matig ongerief (cumulatief van alle handelingen) zullen ondervinden. Mocht dit ongerief overschreden worden dan zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden gehaald (zie punt J voor de specifieke criteria). Dit wordt tijdens de studie bepaald door de algehele conditie van de dieren regelmatig te checken.

Enmalige oropharyngeale toediening van bleomycine onder inhalatie verdoving:	licht ongerief
Longontsteking als gevolg van de bleomycine behandeling:	matig ongerief
Dagelijks/wekelijks wegen:	licht ongerief
Behandeling met therapeutica:	maximaal matig ongerief
Eén of meermaals afnemen van bloed:	licht ongerief
Injectie met tracer stof:	licht ongerief
Euthanasie:	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.

Onze primaire uitleesparameter is de hoeveelheid collageen gevormd in de longen, dit meten we histologisch en biochemisch in de verschillende long lobben. Het longweefsel moet dus worden geïsoleerd na het euthanaseren van de dieren.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



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 |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="text" value="3.4.4.2"/> | <input type="text" value="Nierfibrose in muis of 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.

Er is op dit moment geen goede therapie beschikbaar ter voorkoming of behandeling van nierfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe therapeutica gericht op het voorkomen van nierfibrose maken wij gebruik van het unilaterale urether obstructie (UUO)- nier fibrose of het nefrectomie model in muis of rat. In het UUO nier fibrose model wordt bij de dieren op dag 0 de ureter vlak onder de nier afgebonden. De schade aan de nier ontstaat acuut. Door deze obstructie kan de urine niet meer uit de nier weg en stapelt zich op waardoor stuwings ontstaat in de bovenliggende nier. Dit heeft als gevolg ontsteking, collageen ophoping en verwijding van de nier tubuli. Dit proces gaat heel snel en binnen een aantal dagen is de nier functie van de aangedane nier volledig verdwenen. De contralaterale nier compenseert hiervoor en neemt de functie deels over. Bij een nefrectomie wordt op dag 0 één van de nieren verwijderd om zo de druk op de contralaterale nier te vergroten. Het doel is dat in deze nier schade aan de nefronen ontstaat, deze schade ontstaat echter zeer langzaam. Dit model komt meer overeen met chronische nier schade. Om de druk op deze nier extra te vergroten en het schade proces sneller te laten verlopen kan een extra trigger worden gegeven. Dit kan bijvoorbeeld door de bloeddruk te verhogen met het hormoon angiotensine of door extra zout aan het dieet toe te voegen.

Aan het preklinisch testen van nieuwe therapeutica gaat altijd een groot traject vooraf (zie 3.4 projectvoorstel). Op grond van de kennis uit dat traject zal in overleg met de partner een gedetailleerd studieplan worden opgesteld. Dit omvat o.a. de rationale voor het testen van de stof in een *in vivo* model en het werkingsmechanisme van de stof. Verder zullen in het studieplan de volgende aspecten worden vastgelegd (afhankelijk van de specifieke vraagstelling; deze zal per studie variëren):

- welke diersoort (muis / rat), geslacht (man / vrouw), stam (bijvoorbeeld C57Bl6/J of een transgene variant)
- Keuze voor het model: UUO (acuut model) of nefrectomie (chronisch model)
- beschrijving van de te testen stoffen, inclusief de te gebruiken concentratie(s)

- het tijdstip van start behandeling (preventief of therapeutisch)
- route van toediening
- frequentie van toediening (variërend van eenmalig tot tweemaal daags)
- experimentduur (voor een UUO studie tussen de 7 en 14 dagen; voor een nefrectomie studie maximaal 17 weken). De looptijd zal per studie aan de IvD worden onderbouwd.
- noodzaak voor tussentijdse bloedafname voor bijvoorbeeld een PK analyse

Een voorbeeld van een veel gebruikt studie design voor het testen van nieuwe therapieën in een preventief behandelregiem ziet er als volgt uit:

						Dag											
Groep	Inductie	Treatment	Route	Dosering	n	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Naïve	saline	SC		7		V			V			V				V
2	UUO	saline	SC		10		V			V			V				V
3	UUO	Compound 1	SC	5 mg/kg	10		↓			↓			↓				↓
4	UUO	Compound 2	SC	5 mg/kg	10		↓			↓			↓				↓
5	UUO	Compound 3	SC	10 mg/kg	10		↓			↓			↓				↓
Inductie (UUO)							X										
Lichaamsgewicht (eerste week dagelijks, daarna 2x per week)						x	x	x	x	x			x			x	x
s.c injectie analgesie							x	x	x	x							
Euthanasie + collectie plasma & weefsels																	†

V - vehkel; ↓ - dose administration

Een voorbeeld van een pilot studie voor het testen van de aanwezige hoeveelheid collageen in een transgene muis stam ziet er als volgt uit:

					Dag											
Groep	Inductie	strain		n	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Sham	Wild type		8												
2	Sham	Transgeen		8												
3	UUO	Wild type		8												
4	UUO	Transgeen		8												
Inductie (UUO)						X										
Lichaamsgewicht (eerste week dagelijks, daarna 2x per week)					x	x	x	x	x			x			x	x
s.c injectie analgesie						x	x	x	x							
Euthanasie + collectie plasma & weefsels																†

Primaire uitleesparameters van een nier fibrose studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de nier m.b.v. histologie en beeldanalyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de nier als maat voor de mate van verbindweefseling (biochemische analyse).

Daarnaast kan, afhankelijk van de exacte vraagstelling, een groot aantal additionele parameters bepaald worden. Voorbeelden zijn: nat gewicht van de nieren, bepalingen in serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse mbv gedeuterend water (D₂O) inbouw, etc.

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.

In muis en rat wordt nier fibrose geïnduceerd door de ureter van één van de nieren (meestal in de linker nier) af te binden met twee ligaturen. Eventueel kan de nier ook volledig worden verwijderd om de druk op de contralaterale nier te vergroten. De nier arterie, nier vene en de ureter worden dan met een ligatuur afgebonden waarna de nier volledig wordt weggenomen.

De dieren worden geopereerd onder isofluraan anesthesie. Peritoneum en de huid wordt gehecht.

Pre- en postoperatief krijgen de dieren pijnstilling; deze wordt tot maximaal 4 dagen na de operatie gegeven.

Verder krijgen de dieren na de operatie extra vocht toegediend en herstellen op een warmtematje.

Door de buikoperatie neemt het lichaamsgewicht de eerste 2-3 dagen af, waarna deze zich weer snel herstelt tot het startgewicht.

Afhankelijk van de vraagstelling van de klant/partner zal een behandelstrategie van de uit te testen compound worden opgesteld, deze zal per studie variëren. Mogelijke variaties zijn:

- het tijdstip van de behandeling (proflactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal 10 dagen, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- eenmalige dosering versus herhaalde toediening (verschil in tijdsduur en intervallen),

- toediening van combinaties van medicijnen,
- route van toediening (waaronder inhalatie, oraal, intra-nasaal, intra-tracheaal, intra-peritoneaal, intraveneus, subcutaan, via osmotische pompjes, sublinguaal of intramusculair).
- tussentijdse bloedafname voor bv PK analyse (Het maximaal af te nemen volume wordt gehandhaafd volgens good practice guideline van Diehl *et al*, J Appl Toxicol. 2001).
- lichaamsgewicht bepaling als maat voor welzijn (eerste 4 dagen na de operatie dagelijks daarna 2 of 3x per week).
- toediening van labels/tracers via intra peritoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water D₂O of BrdU).
- euthanasie methode waarna isolatie van bloed, urine, en nier(en) zal plaatsvinden om de primaire uitleesparameters van de studie te kunnen analyseren.

Het injectievolume van de test compound(s) of tracers zal variëren tussen 5 en 10 ml/kg, maar uiterlijk de maximale verdraagbare dosis per injectieplaats zoals staat vermeld in de 'good practice' guideline van Diehl *et al*.

Details van de studie worden beschreven in het studieplan en voorafgaand aan de studie met de IvD afgestemd.

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

Voor elk studieplan zal een separate power analyse worden uitgevoerd om tot een zo accuraat mogelijke bepaling van het aantal benodigde dieren te komen. Hierbij worden onder andere de volgende gegevens gebruikt:

- Meest recente inschatting van de variatie binnen het model (model vertoont lichte variatie in de tijd)
- Exacte looptijd van experiment (fibrosevorming is tijdsafhankelijk)
- Primaire uitleesparameter (gevoeligheid van de verschillende variabelen is verschillend)
- Gewenste mate van gevoeligheid (dit is een keuze: als bijvoorbeeld eerdere varianten van een te testen stof al een verbetering van 30% lieten hoeft alleen gekeken worden of een nieuwe variant beter is. Dan zou een verbetering van 50% genoeg zijn, terwijl als een pathway nog nooit eerder getest is kan het goed zijn om het experiment gevoeliger in te zetten (bv een gewenste gevoeligheid van 40%)
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de UUO controle groep wordt vergeleken kan beter met ongelijke groepsgroottes worden gewerkt)

Voor het uittesten van nieuwe compounds varieert het aantal dieren tussen de 10 en 15 dieren per groep. De groepsgrootte hangt af van de grootte van het gewenste detecteerbare effect (de fibrose reductie is uitleesparameter afhankelijk).

Als voorbeeld gebaseerd op een power analyse $\alpha = 0.05$ en $1-\beta < 0.80$ voor de detectie van een significante vermindering in collageen hoeveelheid in de nier van 40% is een groepsgrootte van 14 dieren noodzakelijk. We houden er rekening mee dat we 5-10% van de dieren per groep zullen uitvallendoor bv een complicatie na de operatie. Dit gebeurt echter zelden. Dit brengt de groepsgrootte naar 15 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de naïeve/sham controle groep verwachten, zal het aantal dieren per groep hier vaak lager uitvallen.

In deze studie rekenen we met een power van 0.80. Soms wordt in overleg met de klant besloten om de power te verhogen naar 0.90. Het hanteren van een hogere power geeft een grotere kans weer dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad benaderd.

Wanneer het aantal dieren per groep afwijkt van de hierboven beschreven standaard zal de berekening aan de IvD in het afzonderlijke studieplan worden voorgelegd.

B. De dieren

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

Voor het nier fibrose model kan gewerkt worden met mannelijke of vrouwelijke C57BL/6J of 129SV muizen of B/N of Fisher 344 ratten variërend in leeftijd van 6-12 weken oud. De hierboven beschreven stammen/sexe zijn al eerder door ons gebruikt en het lopende fibrose model is hierop uitgebreid gevalideerd.

De stam die nodig is voor het uitvoeren van een studie zal in het studieplan aan de IvD worden toegelicht.

Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal dieren per groep en het aantal groepen. Het aantal groepen in een studie wordt in samenspraak met de klant bepaald door de voorliggende vraagstelling en de groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de power analyse van het te verwachten effect. Details worden voorafgaand aan de studie afgestemd met de IvD.

Gebaseerd op een verwacht aantal nier fibrose studies van 6 per jaar met max 100 muizen per studie wordt het aantal benodigde muizen op maximaal 3000 geschat voor een periode van 5 jaar (6 studies x max. 100 dieren/studie x 5 jaar). De aanvraag voor rat fibrose studies ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een gemiddelde studie omvat 80 ratten, voor een periode van 5 jaar schatten we 800 ratten nodig te hebben.

NB de ervaring leert dat er over de jaren variatie kan plaatsvinden m.b.t. welke fibrose modellen het meest toegepast worden. Dit betekent dat het maximale aantal dieren dat onder deze aanvraag gebruikt zal worden naar verwachting aanmerkelijk lager zal liggen dan een simpele optelsom van de aantallen vermeld in de vier bijlagen bij deze projectaanvraag doet vermoeden.

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 farmaca die in onze nier fibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de partner plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn er in de afgelopen decennia grote stappen gemaakt in het vervangen van *in vivo* studies door *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Echter voor de laatste stap, voordat het klinische programma gestart kan worden, is preklinisch testen in dieren tot nu toe nog noodzakelijk.

Vermindering:

Door optimalisaties van het model proberen we bij te dragen aan vermindering van het aantal benodigde dieren. Zo worden tegenwoordig de operaties onder inhalatie anesthesie uitgevoerd zodat dieren sneller uit narcose ontwaken. Hierdoor is de uitval van dieren verminderd. Verder hebben we voor het UUO model uitgebreide mRNA datasets beschikbaar waardoor tevoren al kan worden gekeken of bepaalde pathways relevant zijn voor dit model.

Verfijning:

De dierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd studieprotocol, de medewerkers op deze studies zijn zeer ervaren en goed getraind. Hierdoor heeft de studie een maximale kwaliteit en wordt stress en ongemak voor de dieren zo laag mogelijk gehouden. De buikoperatie kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. Dagelijks wordt dan ook de algehele gezondheid gecontroleerd en worden de dieren gewogen. De eerste 4 dagen na de operatie krijgen ze tevens pijnstilling toegediend.

Bij verminderd welzijn van de dieren (als het ongerief meer dan matig wordt) zullen de dieren voortijdig uit de studie worden genomen.

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

Om angst en pijn voor de dieren zo veel mogelijk te verminderen, krijgen de dieren ruim voor de operatie pijnstilling en zal de operatie onder inhalatie anesthesie plaats vinden. Postoperatief wordt pijnstilling twee maal

daags, 4 dagen lang gegeven. Verder worden alle werkzaamheden per studie door goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectie van vloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Door de operatie verliest het dier vocht dit vullen we na de operatie aan met warm 0.9% NaCl. De dieren herstellen overnacht op een warmtematje. Ook wordt voer in de kooi geplaatst zodat het dier hier makkelijk bij kan.

Bij het plaatsen van medicatie in bijvoorbeeld een osmotisch pompje onder de huid of in de buikholte, krijgt het dier altijd pre- en postoperatief pijnbestrijding toegediend.

Het welzijn van de dieren wordt dagelijks objectief beoordeeld door verschillende personen. Indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief optreden, zullen de dieren geëuthanaseerd worden. Om uiteindelijk over te gaan tot een humaan eindpunt, hebben wij een scoresysteem opgesteld waarop de dieren getoetst worden. Dit zal het geval zijn als de dieren niet meer eten of drinken, hierdoor ernstig gewicht verliezen (> 25%) of slecht reageren op prikkels (zie J).

De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu.

Afvalmateriaal uit de dierstudie wordt na afloop zorgvuldig gescheiden van het huishoudelijk afval en op juiste wijze afgevoerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voor de UUO of nefrectomie operatie krijgen de dieren pre- en post operatief (4 dagen lang) pijnstilling via subcutane injectie met carprofen (5 mg/kg BW).

Verder wordt het buikvlies voor de incisie eerst lokaal verdoofd met 4% lidocaïne spray.

Gebleken is dat 4 dagen na de operatie de buikwond zodanig hersteld is dat de dieren geen pijnstilling meer nodig hebben. Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal zal ook onder een pre- en postoperatieve pijnstilling regiem (volgens richtlijnen) worden uitgevoerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

nvt

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

nvt

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

nvt

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In het nier fibrose model is het de bedoeling dat de dieren fibrose in de nieren ontwikkelen. De fibrose die ontstaat in de nieren veroorzaakt in de dieren geen pijn. De andere nier neemt zonder problemen de functie over. De druk in deze nier neemt toe, maar schade ontstaat heel langzaam in de tijd.

We maken gebruik van een scoresysteem waarop de dieren dagelijks getoetst worden zodat de dieren zo min mogelijk onnodig zullen lijden. Als de score groter is dan 2 worden de dieren geëuthanaseerd. De dieren worden de eerste week na de operatie dagelijks beoordeeld op lichaamsgewicht. In de eerste 2-3 dagen na de operatie vallen de dieren allemaal af (~10%). Sommige dieren vallen echter in deze periode veel meer af door een bijkomende complicatie die zich voor kan doen na een buikoperatie. Dit komt echter zeer zelden voor.

Mochten de dieren naast het gewichtsverlies ook andere symptomen laten zien (zoals het slecht reageren op prikkels) dan wordt besloten om over te gaan op het uitvoeren van het humane eindpunt.

Om de dieren tijdens de studie goed te beoordelen gebruiken we een humane eindpunt formulier (zie hieronder weergegeven). Dit formulier gebruiken we in alle fibrose studies.

Algemene humane eindpunten formulier:

Dieren dienen te worden geëuthanaseerd indien een **score van 2 of groter** van onderstaande criteria in het experiment signaleerd worden:

Ongeriefcode

A Aanzienlijke gewichtsafname een aantal dagen achtereen (1)

B Abnormaal gedrag bijvoorbeeld:

- B1** - benauwdheid/hijgen (1)
- B2** - speekselvoed (1)
- B3** - minder / niet reageren op prikkels (2)
- B4** - aanhoudend trillen (2)
- B5** - aanhoudend stuip trekken (2)
- B6** - zelfverminking (2)

C Omhoog staan van de haren (1)

D Abnormale houding (1)

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

Uit historische data van studies zien we dat gemiddeld tussen 1 tot 5% van de dieren voortijdig uit studie

worden genomen omdat het ongerief hoger dan matig wordt.

K. Classificatie van ongerief

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

Onze naïeve controle groep zal licht ongerief ondervinden, deze groep wordt niet geopereerd en ontwikkelt geen ziekte verschijnselen. De UUO of nefrectomie dieren zullen maximaal matig ongerief ondervinden. De compound behandelde groepen zullen naar verwachting ook matig ongerief ondervinden.

De experimentduur van het UUO model varieert van 1 tot vier weken waarin de dieren maximaal een matig ongerief (cumulatief van alle handelingen) zullen ondervinden. Mocht dit ongerief overschreden worden dan zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden gehaald (zie punt J voor de specifieke criteria). Dit wordt tijdens de studie bepaald door de algehele conditie van de dieren regelmatig te checken.

Echter, het is weleens voorgekomen (in 0.1% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief omdat er na de operatie een complicatie optreedt) dat dieren acuut verslechteren en we dit niet zagen aankomen. Dieren overlijden dan 's nachts en worden de volgende dag dood in de kooi aangetroffen.

Enmalige nier fibrose inductie : UUO obstructie of nefrectomie onder isofluraan anesthesie :	matig ongerief
Nier fibrose ontwikkeling:	licht ongerief
Dagelijks/wekelijks wegen:	licht ongerief
Behandeling met therapeutica:	maximaal matig ongerief
Een of meermalen afnemen van bloed:	licht ongerief
Injectie met tracer stof:	licht ongerief
Euthanasie:	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.

Onze primaire uitleesparameter is de hoeveelheid collageen gevormd in de nieren, dit meten we histologisch en biochemisch in de nier. De nier(en) moet dus worden geïsoleerd na het euthanaseren van de dieren.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



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 |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="text" value="3.4.4.3"/> | <input type="text" value="Huidfibrose in muis of 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.

Er is op dit moment geen goede therapie beschikbaar ter voorkoming of behandeling van huidfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe anti-fibrotica maken wij gebruik van het bleomycine-geïnduceerde huidfibrosemodel in muis of rat. Dit is wereldwijd het meest gebruikte model gericht op het testen van nieuwe therapieën op het gebied van huidfibrose. Het huidfibrose model wordt geïnduceerd door drie keer per week lokaal (subcutaan) een bleomycine oplossing in de huid te spuiten. Een bijeffect van dit model is dat er ook milde longfibrose ontstaat. Om in dit model zowel huid als longfibrose te kunnen behandelen, willen we een nieuw model ontwikkelen (combinatie model huid en long) waarin zich naast huidfibrose ook voldoende longfibrose ontwikkelt. Dit willen we gaan opzetten door oropharyngeal (zie bijlage 1, dierexperimenten en voorbeeld hieronder) een lage dosering bleomycinedosering in de longen te geven, naast het gebruikelijke subcutane injectie regiem.

Aan het preklinisch testen van nieuwe therapeutica gaat altijd een groot traject vooraf (zie 3.4 projectvoorstel). Op grond van de kennis uit dat traject zal in overleg met de partner een gedetailleerd studieplan worden opgesteld. Dit omvat o.a. de rationale voor het testen van de stof in een *in vivo* model en het werkingsmechanisme van de stof. Verder zullen in het studieplan de volgende aspecten worden vastgelegd (afhankelijk van de specifieke vraagstelling; deze zal per studie variëren):

- welke diersoort (muis / rat), geslacht (man / vrouw), stam (bijvoorbeeld C57Bl6/J of een transgene variant)
- beschrijving van de te testen stoffen, inclusief de te gebruiken concentratie(s)
- het tijdstip van start behandeling (preventief of therapeutisch)
- route van toediening
- frequentie van toediening (variërend van eenmalig tot tweemaal daags)
- experimentduur (de meeste studies zullen vijf weken duren, maximaal 7 weken indien er profylactisch of therapeutisch behandel regiem wordt gevolgd). De looptijd zal per studie aan de IvD worden onderbouwd.

- noodzaak voor tussentijdse bloedafname voor bijvoorbeeld een PK analyse.

Een voorbeeld van een veel gebruikt studie design voor het testen van nieuwe therapeutica in een therapeutisch behandel regime ziet er als volgt uit:

Groep	Inductie	Behandeling	Route	Dosering	n	Days						
						-1	0	7	14	21	28	35
1	PBS	Vehikel	PO;BID	---	7			x	=====	→	†	
2	Bleomycine	Vehikel	PO;BID	---	12			x	=====	→	†	
3	Bleomycine	Comp. A	PO;BID	20 mg/kg	12			x	=====	→	†	
4	Bleomycine	Comp. B	PO;BID	20 mg/kg	12			x	=====	→	†	
5	Bleomycine	Comp. C	PO;BID	20 mg/kg	12			x	=====	→	†	
6	Bleomycine	Referentie compound	PO;BID	50 mg/kg	12			x	=====	→	†	
Matchen van de dieren							x					
Fibrose inductie (sc BLM/ 3x per week)							x	x	x	x	x	x
Body weight (3x per week)							x	x	x	x	x	x
Behandeling (dag 7) met compound (2x daags oraal)								x	x	x	x	x
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (huid)												x

Een voorbeeld van modelontwikkeling van huid - long combinatie model:

Groep	Inductie	OP-dosering	n	Dagen																																			
				-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1	PBS		7		x																																		
2	Bleomycine	5 IU	12		x																																		
3	Bleomycine	10 IU	12		x																																		
4	Bleomycine	15 IU	12		x																																		
Inductie (OP bleomycine in de long)					x																																		
Fibrose inductie huid (sc 3x per week)					x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x		
Body weight (3x per week)					x	x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (huid en long)																																							

De primaire uitleesparameters voor deze studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de dermis m.b.v. histologische analyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de huid als maat voor de mate van verbindweefseling (biochemische analyse). Voor het combinatie model worden naast de huid ook in de long lobben bovenstaande parameters gekwantificeerd.

Daarnaast kan, afhankelijk van de exacte vraagstelling, een groot aantal additionele parameters bepaald worden. Voorbeelden zijn: nat gewicht van de longen, bepalingen in long lavage vloeistof en/of serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse mbv gedeutereerd water (D₂O) inbouw, etc.

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.

In de muis wordt huid fibrose (en als bijeffect ook milde longfibrose) geïnduceerd door een bleomycine sulfaatoplossing 3 maal per week subcutaan in de geschoren huid te injecteren.

Na de eerste bleomycine injectie neemt het lichaamsgewicht iets af, maar het lichaamsgewicht herstelt zich snel. Voorafgaand aan de 1e bleomycine injecties en aan het eind van de studie zal de externe huiddikte van de muizen worden gemeten, dit gebeurt onder een isofluraan roesje.

Afhankelijk van de vraagstelling van de klant zal een behandelstrategie van de uit te testen compound worden opgesteld, deze zal per studie variëren. Mogelijke variaties zijn:

- het tijdstip van de behandeling (profylactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal vijf weken, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- metingen van externe huiddikte (met welk interval; wekelijks of alleen bij start en eind studie)
- route en frequentie van compound toediening (waaronder inhalatie, oraal, intra-nasaal, intra-tracheaal, intra-peritoneaal, intraveneus, subcutaan, via osmotische pompjes, sublinguaal of intramusculair).
- tussentijdse bloedafname voor bv PK analyse (Het maximaal af te nemen volume wordt gehandhaafd volgens de 'good practice' guideline van Diehl et al.)
- lichaamsgewicht bepaling als maat voor welzijn (2 of 3x per week standaard, maar bij gewichtsafname ook dagelijks). Bij ernstig gewichtsverlies (>25%) of als de dieren ademhalingsproblemen hebben en slecht reageren op externe prikkels zullen de dieren voortijdig uit experiment worden genomen.
- toediening van labels/tracers via intraperitoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water (D₂O) of BrdU).
- non-invasieve (in house) imaging (bijvoorbeeld schade vaststellen aan orgaan met een µCT scan of EchoMRI)
- korte of langere tijd (maximaal 5 uur) vasten voor isoleren van bloed of urine
- euthanasie methode waarna isolatie van bloed, huid en/of longvloeistof en longen zal plaatsvinden om de primaire uitleesparameters van de studie te kunnen analyseren.

Het injectievolume van de test compound(s) of tracers zal variëren tussen 5 en 10 ml/kg, maar uiterlijk de

maximale verdraagbare dosis per injectieplaats zoals staat vermeld in de 'good practice' guideline van Diehl et al.

Details van de studie worden beschreven in het studieplan en voorafgaand aan de studie met de IvD afgestemd.

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

Voor elk studieplan zal een separate power analyse worden uitgevoerd om tot een zo accuraat mogelijke bepaling van het aantal benodigde dieren te komen. Hierbij worden onder andere de volgende gegevens gebruikt:

- Meest recente inschatting van de variatie binnen het model (model vertoont lichte variatie in de tijd)
- Exacte looptijd van experiment (fibrosevorming is tijdsafhankelijk)
- Primaire uitleesparameter (gevoeligheid van de verschillende variabelen is verschillend)
- Gewenste mate van gevoeligheid (dit is een keuze: als bijvoorbeeld eerdere varianten van een te testen stof al een verbetering van 30% lieten hoeft alleen gekeken worden of een nieuwe variant beter is. Dan zou een verbetering van 50% genoeg zijn, terwijl als een pathway nog nooit eerder getest is kan het goed zijn om het experiment gevoeliger in te zetten (bv een gewenste gevoeligheid van 35%)
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de bleomycine controle groep wordt vergeleken kan beter met ongelijke groepsgroottes worden gewerkt)

Als voorbeeld gebaseerd op een power analyse $\alpha = 0.05$ en $1-\beta < 0.90$ voor de detectie van een significante vermindering in collageen hoeveelheid in de dermis van 35% is een groepsgrootte van 9 dieren noodzakelijk. We houden er rekening mee dat we 5-10% van de dieren per groep zullen uitvallen door ernstig gewichtsverlies of andere ernstige klinische verschijnselen gerelateerd aan het ziektemodel. Dit komt echter zelden voor. Dit brengt de groepsgrootte naar 10 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de negatieve controle groep verwachten (PBS geïnjecteerd en vehikel behandelde groep) en deze groep voornamelijk wordt gebruikt om de mate van fibrose inductie te bepalen zijn hier minder dieren noodzakelijk.

In dit voorbeeld wordt gerekend met een power van 0.90. Het hanteren van een hogere power geeft een grotere kans weer dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad benaderd.

Wanneer het aantal dieren per groep afwijkt van de hierboven beschreven standaard zal de berekening aan de IvD in het afzonderlijke studieplan worden voorgelegd.

NB de ervaring leert dat er over de jaren variatie kan plaatsvinden m.b.t. welke fibrose modellen het meest toegepast worden. Dit betekent dat het maximale aantal dieren dat onder deze aanvraag gebruikt zal worden naar verwachting aanmerkelijk lager zal liggen dan een simpele optelsom van de aantallen vermeld in de vier bijlagen bij deze projectaanvraag doet vermoeden.

B. De dieren

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

Voor het bleomycine geïnduceerde-huidfibrose model wordt voornamelijk gewerkt met vrouwelijke C57BL/6J of DB/A muizen variërend in leeftijd van 6-10 weken oud. **Echter kunnen voor dit type onderzoek ook mannelijke muizen gebruikt worden, geslacht validatie staat op dit moment ingepland.**

De hierboven beschreven stammen/sexe zijn al eerder door ons gebruikt en het huidfibrose model is hierop uitgebreid gevalideerd.

De meeste studies zullen in de muis worden uitgevoerd. Echter kan dit model ook in de rat worden uitgevoerd. Reden om voor het rat model te kiezen zijn o.a. verschillen in werkzaamheid van de therapeutica tussen de species (bv species specifieke antilichamen, verschillen in metabolisme van de compound tussen de species), maar ook beschikbaarheid van data in 1 van de species (het hele voortraject incl. PK studies is bijvoorbeeld in de rat uitgevoerd).

Indien een andere muis stam nodig is voor het uitvoeren van een studie of het ontwikkelen van een nieuw model zal dit in het studieplan aan de IvD worden onderbouwd.

Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal dieren per groep en het aantal groepen. Het aantal groepen in een studie wordt in samenspraak met de klant bepaald door de voorliggende vraagstelling en de groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de power analyse van het te verwachten effect. Details worden voorafgaand aan de studie afgestemd met de IvD.

Gebaseerd op een verwacht aantal huid fibrose studies van 10-12 per jaar met max 100 muizen per studie wordt het aantal benodigde muizen op maximaal 6000 geschat voor een periode van 5 jaar (12 studies x max. 100 dieren/studie x 5 jaar). De aanvraag voor huidfibrose studies in de rat ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een gemiddelde studie omvat 100 ratten, voor een periode van 5 jaar schatten we 1000 ratten nodig te hebben.

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 medicijnen die in onze huidfibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de partner plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn in de afgelopen decennia grote stappen gemaakt in het vervangen van *in vivo* studies door *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Echter voor de laatste stap, voordat het klinische programma gestart kan worden, is preklinisch testen in dieren tot nu toe nog noodzakelijk.

Vermindering:

Door optimalisaties van het model proberen we bij te dragen aan vermindering van het aantal benodigde dieren. Zo zijn we bezig een huid-long combinatie model op te zetten, om in dit model ook meer longfibrose te genereren. We hopen zo in 1 ziektemodel het effect op twee organen te kunnen monitoren.

Verfijning:

De dierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd studieprotocol, de medewerkers op deze studies zijn zeer ervaren en goed getraind. Hierdoor heeft de studie een maximale kwaliteit en wordt stress en ongemak voor de dieren zo laag mogelijk gehouden. De fibrose ontwikkeling kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. Dagelijks wordt dan ook de algehele gezondheid gecontroleerd.

Bij verminderd welzijn van de dieren (als het ongerief meer dan matig wordt) zullen de dieren voortijdig uit de studie worden genomen.

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

Om angst en pijn voor de dieren zo veel mogelijk te verminderen, zal de externe huiddikte worden gemeten onder anesthesie. Verder worden alle werkzaamheden per studie door een klein aantal goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectie van vloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Bij het plaatsen van bv een pompje onder de huid of in de buikholte, krijgt het dier altijd pre en postoperatief pijnbestrijding toegediend.

Het welzijn van de dieren wordt dagelijks objectief beoordeeld door verschillende personen. Indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief optreden, zullen de dieren geëuthanaseerd worden. Om uiteindelijk

over te gaan tot een humaan eindpunt, hebben wij een scoresysteem opgesteld waarop de dieren getoetst worden. Dit zal het geval zijn als de dieren niet meer eten of drinken, hierdoor ernstig gewicht verliezen (> 25%), slecht reageren op prikkels en/of ademhalingsproblemen hebben (zie J).

De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu.

Afvalmateriaal uit de dierstudie (o.a. dierlijk weefsel, gecontamineerd beddingmateriaal of de bleomycine oplossing) wordt na afloop zorgvuldig gescheiden van het huishoudelijk afval en op juiste wijze afgevoerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Om eventueel naast de huidfibrose ook nog extra longfibrose te induceren zullen de dieren onder een roesje van isofluraan gebracht worden, dit is om te zorgen dat de dieren stilliggen en goed de bleomycineoplossing zullen inademen. Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal

wordt uitgevoerd onder een pre- en postoperatieve pijnstilling regiem (volgens wettelijk geldende richtlijnen).

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t

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

n.v.t

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In het huidfibrose model is het de bedoeling dat er lokaal op de plek van injectie huidfibrose ontstaat. Het dier heeft hier geen last van. Echter zal zich in de dieren ook een zeer milde vorm van longfibrose ontwikkelen, waar de dieren geen last van hebben.

Om de dieren goed te monitoren maken we gebruik van een scoresysteem waarop de dieren dagelijks getoetst worden zodat de dieren zo min mogelijk onnodig zullen lijden indien ze toch onverwacht verslechteren.

Als de score groter is dan 2 worden de dieren geëuthanaseerd. Dit komt echter zeer zelden voor. Mochten de dieren naast het gewichtsverlies ook andere symptomen laten zien (zoals het slecht reageren op prikkels) dan wordt besloten om over te gaan op het uitvoeren van het humane eindpunt.

Om de dieren tijdens de studie goed te beoordelen gebruiken we een humane eindpunt formulier (zie hieronder weergegeven). Dit formulier gebruiken we in alle fibrose studies.

Algemene humane eindpunten formulier:

Dieren dienen te worden geëuthanaseerd indien een **score van 2 of groter** van onderstaande criteria in het experiment gesignaleerd worden:

Ongeriefcode

- | | |
|-----------|------------------------------------------------------------|
| A | Aanzienlijke gewichtsafname een aantal dagen achtereen (1) |
| B | Abnormaal gedrag bijvoorbeeld: |
| B1 | - benauwdheid/hijgen (1) |
| B2 | - speekselvoed (1) |
| B3 | - minder / niet reageren op prikkels (2) |
| B4 | - aanhoudend trillen (2) |
| B5 | - aanhoudend stuip trekken (2) |
| B6 | - zelfverminking (2) |
| C | Omhoog staan van de haren (1) |
| D | Abnormale houding (1) |

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

Uit historische data van studies zien we dat gemiddeld tussen 1 tot 5 % van de dieren voortijdig uit studie worden genomen omdat het ongerief hoger dan matig wordt.

K. Classificatie van ongerief

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

Onze negatieve controle groep zal licht ongerief ondervinden, deze groep ontwikkelt geen ziekte verschijnselen. De bleomycine-geïnduceerde groepen zullen maximaal matig ongerief ondervinden en de compound behandelde groepen zullen naar verwachting licht tot matig ongerief ondervinden, omdat de compound mogelijk de fibrose vorming vermindert.

Echter, het komt voor (in 0.5% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief omdat er naast huidfibrose ook meer dan matige longfibrose is ontstaan) dat dieren acuut verslechteren en we dit niet zagen aankomen. Dieren overlijden dan 's nachts en worden de volgende dag dood in de kooi aangetroffen.

De experimentduur van onze modellen varieert van 1 tot enkele weken waarin de dieren maximaal een matig

ongerief (cumulatief van alle handelingen) zullen ondervinden. Mocht dit ongerief overschreden worden dan zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden gehaald (zie punt J voor de specifieke criteria). Dit wordt tijdens de studie bepaald door de algehele conditie van de dieren regelmatig te checken.

Meermalen per week subcutaan injecteren van bleomycine oplossing:	licht ongerief
Huidfibrose als gevolg van de s.c. bleomycine behandeling:	licht ongerief
Milde longfibrose als gevolg van de s.c. bleomycine inductie:	licht-matig ongerief
Eenmalige oropharyngeale toediening van bleomycine onder inhalatie anesthesie*:	licht ongerief
Longfibrose als gevolg van extra oropharyngeale bleomycine inductie*:	matig ongerief
Meten van externe huiddikte onder inhalatie anesthesie:	licht ongerief
2 tot 3 maal per week wegen wegen:	licht ongerief
Behandeling met therapeutica:	maximaal matig ongerief
Eén of meermalen afnemen van bloed:	licht ongerief
Injectie met tracer stof:	licht ongerief
Euthanasie:	licht ongerief

*Dit is van toepassing op het gecombineerde huid-long model

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.

Onze primaire uitleesparameter is de hoeveelheid collageen gevormd in de huid en longen, dit meten we histologisch en biochemisch in de verschillende huidbiopten en long lobben. Er moet dus weefsel worden geïsoleerd na het euthanaseren van de dieren.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



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 |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <input type="text" value="3.4.4.4"/> | <input type="text" value="Leverfibrose in muis of 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.

Er is op dit moment geen goede therapie beschikbaar ter voorkoming of behandeling van leverfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe anti-fibrotica maken wij gebruik van het CCl₄-geïnduceerde leverfibrose muismodel. Dit is wereldwijd het meest gebruikte model gericht op het testen van nieuwe therapieën op het gebied van leverfibrose. Om leverfibrose te induceren krijgen de dieren vanaf dag 0 drie keer in de week, intra-peritoneaal CCl₄ opgelost in mineraal olie toegediend om leverschade te induceren.

Aan het preklinisch testen van nieuwe therapeutica gaat altijd een groot traject vooraf (zie 3.4 projectvoorstel). Op grond van de kennis uit dat traject zal in overleg met de partner een gedetailleerd studieplan worden opgesteld. Dit omvat o.a. de rationale voor het testen van de stof in een *in vivo* model en het werkingsmechanisme van de stof. Verder zullen in het studieplan de volgende aspecten worden vastgelegd (afhankelijk van de specifieke vraagstelling; deze zal per studie variëren):

- welke diersoort (muis / rat), geslacht (man / vrouw), stam (bijvoorbeeld C57Bl6/J of een transgene variant)
- beschrijving van de te testen stoffen, inclusief de te gebruiken concentratie(s)
- het tijdstip van start behandeling (preventief of therapeutisch)
- route van toediening
- frequentie van toediening (variërend van eenmalig tot tweemaal daags)
- experimentduur (meestal vier weken (profy lactisch behandelregiem) of zes weken (therapeutisch behandelregiem)). De looptijd zal per studie aan de IvD worden onderbouwd.- noodzaak voor tussentijdse bloedafname voor bijvoorbeeld een PK analyse.

Een voorbeeld van een veel gebruikt studie design voor het profylactisch testen van nieuwe therapieën ziet er als volgt uit:

					days:																		
Groep	Inductie	Behandeling	Route	Dosering n	-7	0	2	3	4	7	9	10	11	14	16	17	18	21	23	24	25	28	
1	Mineral Oil	vehikel	i.p. (2x week)	-- 7																			
2	CCl ₄	vehikel	i.p. (2x week)	-- 10	x																		†
3	CCl ₄	Compound -1	i.p. (2x week)	10 mg/kg 10	x																		†
4	CCl ₄	Compound -2	i.p. (2x week)	25 mg/kg 10	x																		†
5	CCl ₄	Compound -3	i.p. (2x week)	30 mg/kg 10	x																		†
Body weight (3x week)					x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	
CCl ₄ of minerale olie injectie (i.p., 3x week)						x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x		
Behandeling (i.p., 2x week)						x		x		x		x		x		x		x		x			
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (lever)																							x

Een voorbeeld van het leverfibrose model in de vorm van een tijdreeks voor het verkrijgen van genexpressie data en biomarker materiaal:

					days:																		
Groep	Inductie	D2O bolus	D2O drinkingwater	n	-7	0	2	3	4	7	9	10	11	14	16	17	18	21	23	24	25	28	
1	Mineral Oil	D0	D0-28	8	x																		†
2	CCl ₄	D0	D0-D7	8	x				†														
3	CCl ₄	D7	D7-D14	8	x																		†
4	CCl ₄	D14	D14-D21	8	x																		†
5	CCl ₄	D21	D21-D28	8	x																		†
Body weight (3x week)					x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	
CCl ₄ of minerale olie injectie (i.p., 3x week)						x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x		
D2O bolus (via ip injectie)						x			x				x				x						
8% D2O administration (via het drink water)						x	x	x	x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x
Urine / plasma collectie						x			x				x				x						x
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (lever)																							x

De primaire uitleesparameters voor deze studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de lever m.b.v. histologische analyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de lever als maat voor de mate van verbindweefseling (biochemische analyse).

Daarnaast kan, afhankelijk van de exacte vraagstelling, een groot aantal additionele parameters bepaald worden. Voorbeelden zijn: nat gewicht van de lever lobben, bepalingen in serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse m.b.v. geïnduceerd water (D₂O) inbouw, etc.

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.

In de muis wordt leverfibrose geïnduceerd door CCl₄ opgelost in minerale olie drie keer per week intra-peritoneaal in te spuiten (0.75 ml/kg; 5 ml/kg). De controlegroep krijgt alleen minerale olie geïnjecteerd. Langdurige blootstelling aan CCl₄ veroorzaakt in de lever cirrose en fibrose doordat het schade aan de hepatocyten veroorzaakt door de gevormde radicaal metabolieten. Hierdoor ontstaat centrolobulair milde necrose en fibrose. Na de eerste CCl₄ injectie neemt het lichaamsgewicht van de muizen wat af (5-10%). Dit herstelt zich in de eerste week van de studie vaak weer.

Afhankelijk van de vraagstelling van de klant zal een behandelstrategie van de uit te testen compound worden opgesteld, deze zal per studie variëren. Mogelijke variaties zijn:

- het tijdstip van de behandeling (profylactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal vier tot zes weken, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- route en frequentie van compound toediening (waaronder inhalatie, oraal, intra-nasaal, intra-tracheaal, intra-peritoneaal, intraveneus, subcutaan, via osmotische pompjes, sublinguaal of intramusculair).
- tussentijdse bloedafname voor bv PK analyse (Het maximaal af te nemen volume wordt gehandhaafd volgens de 'good practice' guideline van Diehl *et al.*)
- lichaamsgewicht bepaling als maat voor welzijn (2 of 3x per week standaard, maar bij gewichtsafname ook dagelijks). Bij ernstig gewichtsverlies (>25%) of als de dieren ademhalingsproblemen hebben en slecht reageren op externe prikkels zullen de dieren voortijdig uit experiment worden genomen.
- toediening van labels/tracers via intra-peritoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water (D₂O) of BrdU).

- non-invasieve (in house) imaging (bijvoorbeeld schade vaststellen aan orgaan met een μ CT scan of EchoMRI)
- korte of langere tijd (maximaal 5 uur) vasten voor isoleren van bloed of urine
- euthanasie methode waarna isolatie van bloed, longvloeistof en longen zal plaatsvinden om de primaire uitleesparameters van de studie te kunnen analyseren.

Het injectievolume van de test compound(s) of tracers zal variëren tussen 5 en 10 ml/kg, maar uiterlijk de maximale verdraagbare dosis per injectieplaats zoals staat vermeld in de 'good practice' guideline van Diehl *et al.*

Details van de studie worden beschreven in het studieplan en voorafgaand aan de studie met de IvD afgestemd.

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

Voor elk studieplan zal een separate power analyse worden uitgevoerd om tot een zo accuraat mogelijke bepaling van het aantal benodigde dieren te komen. Hierbij worden onder andere de volgende gegevens gebruikt:

- Meest recente inschatting van de variatie binnen het model (model vertoont lichte variatie in de tijd)
- Exacte looptijd van experiment (fibrosevorming is tijdsafhankelijk)
- Primaire uitleesparameter (gevoeligheid van de verschillende variabelen is verschillend)
- Gewenste mate van gevoeligheid (dit is een keuze: als bijvoorbeeld eerdere varianten van een te testen stof al een verbetering van 30% lieten hoeft alleen gekeken worden of een nieuwe variant beter is. Dan zou een verbetering van 50% genoeg zijn, terwijl als een pathway nog nooit eerder getest is kan het goed zijn om het experiment gevoeliger in te zetten (bv een gewenste gevoeligheid van 20%)
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de CCl₄ controle groep wordt vergeleken kan beter met ongelijke groepsgroottes worden gewerkt)

Als voorbeeld: gebaseerd op een power analyse met $\alpha = 0.05$ en $1-\beta < 0.80$ voor de detectie van een significante vermindering in collageen in de lever van 30% is een groepsgrootte van 9 dieren noodzakelijk (als alle groepen met elkaar vergeleken worden).

We houden er rekening mee dat per groep 5-10% dieren voortijdig uit experiment moeten worden gehaald door ernstig gewichtsverlies of andere ernstige klinische verschijnselen gerelateerd aan het i.p. inspuiten van CCl₄ om deze ziekte te induceren. Wanneer CCl₄ per ongeluk in het colon of de nier wordt gespoten, sterft het dier een paar minuten na de injectie. We passen daarom de groepsgrootte aan naar 10 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de negatieve controle groep verwachten (saline geïnduceerde en vehikel behandelde groep) en deze groep voornamelijk wordt gebruikt om de mate van inductie te bepalen zijn hier minder dieren noodzakelijk, te weten 6-8.

In deze studie rekenen we met een power van 0.80. Soms wordt in overleg met de klant besloten om de power te verhogen naar 0.90. Het hanteren van een hogere power geeft een grotere kans weer dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad benaderd.

Wanneer het aantal dieren per groep afwijkt van de hierboven beschreven standaard zal de berekening aan de IvD in het afzonderlijke studieplan worden voorgelegd.

B. De dieren

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

Voor het CCl₄ geïnduceerde-leverfibrose muis model kan gewerkt worden met mannelijk C57BL/6J muizen variërend in leeftijd van 8-12 weken oud. Vrouwelijke C57Bl/6J muizen ontwikkelen minder leverfibrose bij dezelfde CCl₄ dosis dan mannelijke dieren (uit eigen studies en discussies met partners bekend).

De hierboven beschreven stam/sexen zijn al eerder door ons gebruikt en het huidige model is hierop uitgebreid gevalideerd. De meeste studies zullen in muis worden uitgevoerd. Wij krijgen in toenemende mate verzoeken om stoffen in de rat te testen. Indien dit inderdaad noodzakelijk blijkt, zal dit model eerst verder in ratten gevalideerd worden. **In deze validatie zal ook gekeken worden of de bij muizen waargenomen geslachtsafhankelijke verschillen ook in de rat op treden. Op basis hiervan zal besloten worden of beide geslachten bruikbaar zijn om voor een lever fibrose studie in te zetten.**

Redenen om voor een ratmodel te kiezen zijn o.a. verschillen in werkzaamheid van de therapeutica tussen de

species (bv species specifieke antilichamen, verschillen in metabolisme van de compound tussen de species), maar ook beschikbaarheid van data in 1 van de species (het hele voortraject incl. PK studies is in rat uitgevoerd).

Indien een andere muis of rat stam nodig is, zal dit in het studieplan aan de IvD worden onderbouwd.

Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal dieren per groep en het aantal groepen. Het aantal groepen in een studie wordt in samenspraak met de klant bepaald door de voorliggende vraagstelling en de groeps grootte wordt bepaald aan de hand van de power analyse van het te verwachten effect. Details worden voorafgaand aan de studie afgestemd met de IvD.

Gebaseerd op een verwacht aantal leverfibrose studies van 10-12 per jaar met max 100 muizen per studie wordt het aantal benodigde muizen op maximaal 6000 geschat voor een periode van 5 jaar (12 studies x max. 100 dieren/studie x 5 jaar). De aanvraag voor rat leverfibrose studies ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een studie omvat 60-100 ratten per studie, voor een periode van 5 jaar schatten we 1000 ratten nodig te hebben. Dit is inclusief het aantal ratten die voor validatie van het model nodig zullen zijn.

NB de ervaring leert dat er over de jaren variatie kan plaatsvinden m.b.t. welke fibrose modellen het meest toegepast worden. Dit betekent dat het maximale aantal dieren dat onder deze aanvraag gebruikt zal worden naar verwachting aanmerkelijk lager zal liggen dan een simpele optelsom van de aantallen vermeld in de vier bijlagen bij deze projectaanvraag doet vermoeden.

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 farmaca die in onze leverfibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de partner plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn er in de afgelopen decennia grote stappen gemaakt in het vervangen van *in vivo* studies door *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Echter, voor de laatste stap, voordat het klinische programma gestart kan worden, is preklinisch testen in dieren tot nu toe nog noodzakelijk.

Vermindering:

Door optimalisaties van het model proberen we bij te dragen aan vermindering van het aantal benodigde dieren. Verder willen we voor dit model uitgebreide mRNA datasets gaan verzamelen waardoor van tevoren al kan worden gekeken of bepaalde pathways relevant zijn voor dit model.

Verfijning:

De dierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd studieprotocol, de medewerkers op deze studies zijn zeer ervaren en goed getraind. Hierdoor heeft de studie een maximale kwaliteit en wordt stress en ongemak voor de dieren zo laag mogelijk gehouden. De fibrose ontwikkeling kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. Dagelijks wordt dan ook de algehele gezondheid gecontroleerd.

Bij verminderd welzijn van de dieren (als het ongerief meer dan matig wordt) zullen de dieren voortijdig uit de studie worden genomen.

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

Alle werkzaamheden per studie worden door een gering aantal goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectie vloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Bij het plaatsen van bv een osmotisch pompje onder de huid of in de buikholte, krijgt het dier altijd pre- en postoperatief pijnbestrijding toegediend.

Het welzijn van de dieren wordt dagelijks objectief beoordeeld door verschillende personen. Indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief optreden, zullen de dieren geëuthanaseerd worden. Om uiteindelijk over te gaan tot een humaan eindpunt, hebben wij een scoresysteem opgesteld waarop de dieren getoetst worden. Dit zal het geval zijn als de dieren niet meer eten of drinken, hierdoor ernstig gewicht verliezen (> 25%) en/of slecht reageren op externe prikkels (zie J).

De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu. Afvalmateriaal uit de dierstudie (o.a. dierlijk weefsel, CCl₄ oplossing) wordt na afloop zorgvuldig gescheiden van het huishoudelijk afval en op juiste wijze afgevoerd.

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. dit is geen wettelijk vereist onderzoek](#)

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.

Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal zal ook onder een pre- en postoperatief pijnstillingsregiem (volgens wettelijk geldende richtlijnen) worden uitgevoerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t

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

n.v.t

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In het leverfibrose model is het de bedoeling dat de dieren fibrose in de lever ontwikkelen. De fibrose die ontstaat in de lever veroorzaakt zelf geen pijn in de dieren. We zien wel dat na de eerste CCl₄ injecties de dieren soms een geringe gewichtsafname (5-10%) laten zien. Meestal zijn de dieren binnen een week weer op het startgewicht.

Verder worden de dieren behandeld met therapeutica, dit kan het welzijn van de dieren negatief beïnvloeden. Om de dieren goed te monitoren maken we gebruik van een scoresysteem waarop de dieren dagelijks getoetst worden zodat de dieren zo min mogelijk onnodig zullen lijden indien ze toch onverwacht verslechteren. Dit scoresysteem is oorspronkelijk ontwikkeld voor het beoordelen van muizen met longfibrose, maar wordt nu ook toegepast bij de overige fibrosemodellen.

Als de score groter is dan 2 worden de dieren geëuthanaseerd. Dit komt echter zeer zelden voor. Mochten de dieren naast het gewichtsverlies ook andere symptomen laten zien (zoals het slecht reageren op prikkels) dan wordt besloten om over te gaan op het uitvoeren van het humane eindpunt.

Om de conditie van de dieren tijdens de studie goed te kunnen beoordelen gebruiken we een humane eindpunt formulier (zie hieronder weergegeven). Dit formulier gebruiken we in alle fibrose studies.

Algemene humane eindpunten formulier:

Dieren dienen te worden geëuthanaseerd indien een **score van 2 of groter** van onderstaande criteria in het experiment gesignaleerd worden:

Ongeriefcode

A Aanzienlijke gewichtsafname een aantal dagen achtereen (1)

B Abnormaal gedrag bijvoorbeeld:

B1 - benauwdheid/hijgen (1)

B2 - speekselvoed (1)

B3 - minder / niet reageren op prikkels (2)

B4 - aanhoudend trillen (2)

B5 - aanhoudend stuip trekken (2)

B6 - zelfverminking (2)

C Omhoog staan van de haren (1)

D Abnormale houding (1)

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

Uit historische data van studies zien we dat gemiddeld tussen 1 tot 5% van de dieren voortijdig uit studie worden genomen omdat het ongerief hoger dan matig wordt.

K. Classificatie van ongerief

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

Onze negatieve controlegroep zal licht ongerief ondervinden, deze groep ontwikkelt geen ziekteverschijnselen. De CCl₄ geïnduceerde groepen zullen maximaal matig ongerief ondervinden en de compound behandelde groepen zullen naar verwachting licht tot matig ongerief ondervinden, omdat de compound mogelijk de fibrose vorming vermindert.

Echter, het komt soms voor (in 0.5% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief door leverfibrose) dat dieren acuut verslechteren en we dit niet zagen aankomen. Dieren overlijden dan 's nachts en worden de volgende dag dood in de kooi aangetroffen.

De experimentduur van onze modellen varieert van minimaal 4 tot ca. 6 weken waarin de dieren maximaal een matig ongerief (cumulatief van alle handelingen) zullen ondervinden. Mocht dit ongerief overschreden worden dan zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden gehaald (zie punt J voor de specifieke criteria). Dit wordt tijdens de studie bepaald door de algehele conditie van de dieren regelmatig te checken.

Drie keer per week i.p. injecteren van CCl ₄ oplossing:	matig ongerief
Lever ontsteking als gevolg van CCl ₄ toediening:	licht ongerief
Dagelijks/wekelijks wegen:	licht ongerief
Behandeling met medicijnen/compound:	maximaal matig ongerief
Een of meermalen afnemen van bloed:	licht ongerief
Injectie met tracer stof:	licht ongerief
Euthanasie:	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.

Onze primaire uitleesparameter is de hoeveelheid collageen gevormd in de lever, dit meten we histologisch en biochemisch in de verschillende lever lobben. De lever moet dus worden geïsoleerd na het euthanaseren van de dieren.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer :
2. Titel van het project : Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen.
3. Titel van de NTS : Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces in diermodellen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer:

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC TNO

Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]

Emailadres contactpersoon: [REDACTED]

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

- ontvangen door DEC: 6-2-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 14-2-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : van 20-2-2017 tot 26-5-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag: 26-5-2017
- advies aan CCD: 14-6-2017

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: n.v.t.
- Plaats: n.v.t.
- Aantal aanwezige DEC-leden: n.v.t.
- Aanwezige (namens) aanvrager: n.v.t.
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: n.v.t.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag. n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 20-2-2017
- Datum antwoord: 26-5-2017
- Gestelde vragen en antwoorden: Zie hieronder

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

Vraag 1: Het hoofddoel is ons helder, evenals hoe u te werk gaat bij het testen van nieuwe anti-fibrotische therapieën. Echter, in de beschreven strategie (3.4.1.) missen wij informatie over de strategie met betrekking tot de resterende studies die onder deze projectaanvraag zullen worden uitgevoerd. Hoe bepaalt u waar u aan gaat werken bij de onderdelen 3 en 4 (3.4.3)? Het is voor ons van belang om inzicht te hebben in het grotere verhaal: hoe bepaalt u waar de prioriteiten liggen in het onderzoek en wat de prioriteiten zijn voor de periode (5 jaar) van deze vergunning? Wat is de voorgeschiedenis, wat zijn de knelpunten in het fibroseonderzoek en hoe passen de onderzoeksvragen bij 3 en 4 hierin?

De modellen die we momenteel gebruiken (in deze aanvraag) zijn gekozen op basis van de volgende argumenten:

- In de literatuur zijn deze modellen het meest gebruikt
- Deze modellen zijn door de farmaceutische industrie het meest geaccepteerd voor de ontwikkeling van geneesmiddelen. De FDA eist dat nieuwe geneesmiddelen getest zijn voordat deze geaccepteerd worden op de markt.

Knelpunten in het fibroseonderzoek:

- De readout parameters zijn niet optimaal voor gebruik in zowel een profylactische als therapeutische test setting
- Hoe translationeel zijn onze modellen

TNO wil graag deze modellen verbeteren teneinde tot goed gevalideerde modellen te komen. De prioriteiten liggen op de volgende punten:

- Reproduceerbaarheid van de verschillende modellen verbeteren
- Welke uitlees parameters wordt er gebruikt
- Welk deel vd pathways in de patiënt worden gerepresenteerd in de modellen
- Hoe kunnen modellen het best gebruikt worden in een therapeutische setting (bijvoorbeeld het gebruik van zwaar water in therapeutische setting)

In het verleden hebben we al een aantal van deze punten geadresseerd en de komende 5 jaar willen we ons in het onderzoek vooral verder richten op:

- Het beter begrijpen vd fibrose processen die een rol spelen in deze modellen en deze processen vergelijken met de processen in de patiënt (systeem biologische aanpak; vergelijk met humaan materiaal)
- Het optimaliseren van read-out parameters zodat op een effectieve manier zowel profylactische als therapeutische protocollen getoetst kunnen worden

Vraag 2: Voor de pathways wordt gebruik gemaakt van transgene muizen. Kunt u meer inzicht geven in wanneer het van belang is om deze dieren te gebruiken? Betreft het hier bestaande transgene lijnen? En hebben deze dieren ongerief als resultaat van de genetische wijziging?

Het gebruik van transgene muizen kan inzicht geven in de processen die betrokken zijn bij fibrose omdat specifieke pathways aan / uit gezet zijn.

De toepassing zal vooral gericht zijn om meer inzicht in de fibrose processen te krijgen en niet specifiek om deze te gebruiken voor het uittesten van compounds. Op dit moment zullen we alleen gebruik maken van bestaande transgene muizenlijnen, het ongerief van transgene deze dieren zal niet meer zijn dan het in de aanvraag geclassificeerde maximale ongerief van 3 (cumulatief gezien).

Vraag 3: Wij begrijpen van de IvD dat u veel energie steekt in literatuuronderzoek. Kunt u ons inzicht geven in uw strategie hieromtrent en uw bevindingen? En concreet: u geeft aan dat de genoemde modellen de beste zijn voor uw onderzoek. Met welke modellen vergelijkt u deze modellen? Is dit ook afgezet tegen in vitro modellen?

Literatuur onderzoek is een van de bronnen waaruit we informatie putten betreffende de verschillende fibrose modellen. Zo heeft een uitgebreid literatuur onderzoek op het gebied van longfibrose ons doen besluiten te stoppen met de intra-tracheale toediening van bleomycine en over te stappen op oropharygeale toediening. Helaas hebben we onder andere n.a.v. een systematische review op het gebied van longfibrose geleerd dat veel van de literatuur op het gebied van de verschillende modellen soms grote omissies vertoont (zo wordt het optreden van sterfte tijdens de proef vaak bijzonder slecht gerapporteerd) waardoor studies roodkleuriger voorgesteld worden dan dat onze ervaringen zijn. Daarom putten wij ook sterk uit ons grote netwerk van in vivo experts binnen de bedrijven. Onze ervaringen zijn dat deze experts vaak veel kritischer zijn t.o.v. de modellen en eventuele positieve therapie effecten dan de academische wereld en vaak zeer bereidwillig zijn om tot in detail over de voors en tegens van de modellen te discussiëren.

Er zijn verschillende modellen in de literatuur beschreven waarbij fibrose chirurgisch, chemisch, genetisch of mechanisch wordt geïntroduceerd in de verschillende organen.

Wij hebben bij TNO ook verschillende van deze modellen uitgetest (zoals het bileduct ligatie model of MCD dieet geïnduceerde fibrose model (methionine-choline deficiënte- dieet) om leverfibrose te induceren; het 5/6 massa reductie of ischemi model (voor nier fibrose) en het brandwonden of wondheling (punch) model voor huidfibrose.

De modellen die we nu aanbieden worden in het fibrose veld het meest frequent gebruikt en weerspiegelen de histopathologie die gelijk is aan die van bijvoorbeeld IPF of systemische sclerose patiënten. Tevens zijn de inductie en uitleesparameters van deze modellen heel goed reproduceerbaar gebleken. Ook belangrijk is dat deze modellen al

bijgedragen hebben aan EFDA goedkeuring van bestaande therapiemogelijkheden en daarmee een bijdrage kunnen leveren bij het valideren van nieuwe therapieën.

Het translationele aspect is voor TNO heel belangrijk, hetgeen geldt voor zowel in-vivo modellen als in-vitro modellen. Daarom hebben we naast het optimaliseren / valideren van in-vivo modellen ook een programma op het gebied van in-vitro modellen.

Bijvoorbeeld het ontwikkelen van een 3D voorspellend in-vitro model voor leverfibrose.

Ook voor de in-vitro modellen willen we weten welk deel van de processen in de patiënt representatief is, zodat we in de toekomst op basis van de te testen target kunnen besluiten of de studie in-vitro of in-vivo uitgevoerd zal moeten worden.

Vraag 5: Bij punt 3.2 vermeldt u dat het er subdoelen in het project zijn geïntegreerd, zoals het uittesten van positieve nieuwe controles. Waarom is dit een noodzakelijk doel?

Positieve controles bij het testen van nieuwe therapeutica worden gebruikt om vast te stellen of het model naar behoren heeft gefunctioneerd en dient als benchmark om het effect van de stof te vergelijken met bekende stoffen zodat bijvoorbeeld meerdere studies eenvoudiger met elkaar kunnen worden vergeleken. De twee op de markt toegelaten middelen (pirfenidone en nintedanib; alleen toegelaten voor longfibrose), hebben in onze modellen maar een zeer matig effect in zowel patiënt als in de muis. In het laatste geval is een andere referentiestof niet perse meer betrouwbaar. Om beter te kunnen benchmarken is er daarom een zeer grote behoefte aan (nieuwe) betrouwbaardere referentie compounds.

Vraag 6: Kunt u toelichten hoe extra controles het ongerief kunnen verminderen vóór het bereiken of overschrijden van de humane eindpunten?

Onze enige parameter die we in de looptijd van een studie kunnen monitoren, is het lichaamsgewicht van de dieren. Bleomycine of CCl₄ geïnduceerde dieren verliezen in de eerste week gewicht, dit hoort bij het ziektemodel.

Na deze periode neemt het lichaamsgewicht weer langzaam toe. In een studie zijn er soms enkele dieren die gewicht blijven verliezen na de eerste week van inductie. Uit ervaring weten we dat als deze dieren een aantal dagen achter elkaar gewicht blijven verliezen het herstel niet aannemelijk zal zijn.

Door dagelijks deze dieren extra te monitoren (gewicht bepalen en tevens ook alle punten van het humane eindpuntformulier) kunnen we het verloop van het ziekteproces goed inschatten. We grijpen in voordat het dier andere duidelijkere symptomen van ongerief laat zien en halen dieren dan ook eerder uit een studie.

Vraag 7: We vragen u de duur van de proef nader te preciseren. Is er bijvoorbeeld een maximum duur te noemen?

Dit is gepreciseerd in de bijlagen. Over het algemeen zal een Longfibrose studie 3 weken duren, lever fibrose studie 4 weken, Nier fibrose studie 10 dagen en een huidfibrose studie 5 weken. Echter, als er bijvoorbeeld meer naar latere start van de therapie gekeken wordt of als er bijvoorbeeld naar effecten van stoffen op resolutie van fibrose gekeken zal worden, zal het mogelijk nodig zijn om de duur van de proef te verlengen met twee tot vijf weken.

Vraag 8: U stelt dat behandeling met therapeutica maximaal matig ongerief zal opleveren. Waar bestaat dat ongerief uit? Kunt u dit toelichten?

Ongerief door behandeling in onze modellen vindt voornamelijk plaats door bijvoorbeeld 2 x daags gavage, dagelijkse i.v. injectie of het plaatsen van een subcutane pomp.

Vraag 9: In de bijlagen is sprake van een wisselende power (0,8 / 0,9). Wat is daar de reden van?

In het algemeen wordt er voor het soort studies dat in deze aanvraag wordt besproken met een power van 0,8 gerekend. Soms wordt in overleg met de partner met wie we de studie uitvoeren besloten om de power naar 0,9 te verhogen. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn als de studie doorslaggevend is voor het doen van verdere investeringen in een onderzoeksprogramma. Hier geeft het hanteren van een hogere power een grotere kans dat de gekozen groeps grootte de werkelijkheid inderdaad weergeeft en daarmee het besluit om een programma voort te zetten of te stoppen op een zo solide mogelijke basis wordt genomen.

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

- Aard expertise: n.v.t.
- Deskundigheid expert: n.v.t.
- Datum verzoek: n.v.t.
- Strekking van het verzoek: n.v.t.
- Datum expert advies: n.v.t.
- Advies expert: n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het gaat om een project rond fibrose, met een duidelijke strategie en opzet. De samenhang bestaat eruit dat in diverse organen een vergelijkbaar fibroseproces kan ontstaan, waardoor het zinvol heeft dit proces in die organen in samenhang te bestuderen. De verschillende studies kunnen informatie opleveren die van nut zijn bij de overige studies. De DEC heeft om uitleg gevraagd over het includeren van een subdoel. Naar aanleiding van het uitgebreide antwoord op deze vraag begrijpt de DEC dat ook dit doel een directe invulling is van het eerste subdoel van de aanvraag, namelijk validatie en verdere optimalisatie van de modellen. De DEC concludeert dat studies naar het fibroseproces en therapieën in dit project worden gecombineerd met studies naar het verbeteren van modellen en uitleesparameters. Voor de DEC is juist deze combinatie een sterk element in dit projectvoorstel, omdat daarmee het werken voor opdrachtgevers gecombineerd wordt met een sterke eigen inhoudelijke kennis en de daadwerkelijke mogelijkheid om modellen te verbeteren. Zie hiervoor ook element 7 van het advies met betrekking tot de proefopzet en haalbaarheid. De DEC heeft ook uitgebreid gesproken over het samenbrengen van 4 fibrosemodellen in een aanvraag. Daarbij is de conclusie van de DEC dat het juist essentieel is om deze fibrosemodellen niet te scheiden omdat a) in mensen ook verschillende organen aangetast kunnen zijn en b) dit vermindering in het gebruik van dieren kan faciliteren. Dit omdat de modellen niet elk op zichzelf staan, maar net als bij mensen meerdere uitingen van fibrose kunnen laten zien.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en). Er is sprake van translationeel/toegepast onderzoek, waarbij fibrose wordt bestudeerd in het dier in combinatie met de transleerbaarheid naar de mens.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het testen van nieuwe anti-fibrotische therapiemogelijkheden in diverse fibrosemodellen die zo goed mogelijk bijdragen aan het voorspellen van klinische effectiviteit. Het uiteindelijke doel van het project is de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen fibrose. De DEC TNO ziet deze samenhang duidelijk. Door het testen van therapieën, met daarbij extra aandacht voor de transleerbaarheid naar de mens, kan dit project bijdragen aan het daadwerkelijk ontwikkelen van goede medicijnen tegen fibrose. 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: fibrosepatiënten en de muizen en ratten die als proefdier gebruikt worden. Daarnaast hebben opdrachtgevers belang bij

informatie over hun product. Ook de uitvoerende organisatie en de medewerkers die aan het onderzoek werken hebben een belang. Voor de patiënten zijn in het geding de waarden: leven, gezondheid, welzijn, activiteiten kunnen ontplooiën. Voor de proefdieren zijn in het geding de waarden: leven, gezondheid, welzijn en natuurlijk gedrag kunnen vertonen. Voor de opdrachtgevers en de uitvoerende organisatie gaat het voornamelijk om een economisch belang. Voor de betrokken medewerkers van TNO gaat het om hun professionele ontwikkeling.

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. De dieren worden gehuisvest onder veilige condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu. De vergunninghouder heeft geborgd dat potentieel milieubelastend afvalmateriaal op passende wijze wordt afgevoerd.

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 aanvrager geeft aan bij 3.2 in het projectvoorstel dat de betrokken onderzoekers jarenlange ervaring hebben in het veld, inclusief een uitgebreid inhoudelijk netwerk waarbinnen wordt samengewerkt. In het antwoord op vraag 1 van de DEC aan de aanvrager komt bovendien een duidelijke focus naar voren die de haalbaarheid versterkt. Op grond van deze beschrijvingen ziet de DEC geen reden om te twijfelen aan de haalbaarheid zoals die is omschreven. Dit geldt ook voor de toepassing van de 3 V's, mede door het antwoord op de door de DEC gestelde vraag 3, naar literatuuronderzoek inzake modellen. Hier geeft de aanvrager aan goed op de hoogte te zijn van actuele literatuur, maar ook met een kritische houding staat tegenover de publicaties in dit veld. De aanvrager beschrijft derhalve een netwerk van experts waar men een reëler beeld vindt van de transleerbaarheid van de resultaten in dit veld.
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. De aanvrager beschrijft een uiteindelijk doel van de onderzoekslijn, maar specificeert ook concrete, haalbare doelen voor dit project: therapiemogelijkheden testen en daarbij modellen voor fibrose verbeteren wat betreft het voorspellen van klinische effectiviteit. De DEC neemt mee in haar wegging dat een deel van het project ingegeven wordt door de mogelijkheid om het diermodel en daarmee de transleerbaarheid te verbeteren. Het antwoord getuigt van het feit dat deze verbeteringen daadwerkelijk haalbaar zijn en zelfs tot verbeteringen kunnen leiden in de internationale gemeenschap in handen van deze groep. De aanvrager stelt namelijk niet alleen modellen te verbeteren, maar de wegen te kennen om ook de acceptatie van dergelijke verbeteringen door de FDA te realiseren. Het antwoord van vraag 1 samen met vraag 3 geeft in

de ogen van de DEC een unieke combinatie weer van een onderzoeksomgeving waar het probleem wordt aangepakt met een multidisciplinair team met expertise en netwerk op het gebied van fibrose in vitro, in vivo, translatie en wet- en regelgeving.

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. Het is ingeschat als voor het gros van de dieren maximaal matig en voor een klein percentage ernstig (0,5%). De DEC is van mening dat deze percentages realistisch zijn ingeschat. De DEC heeft gediscussieerd over de vraag of extra monitoring dit percentage zou kunnen verlagen. In het antwoord op vraag 6 van de DEC maakt de aanvrager duidelijk dat de monitoring passend is ingeregeld om het percentage dieren dat ernstig ongerief ondergaat zeer laag te houden. Daarnaast maakt de aanvrager in het antwoord op vraag 2 van de DEC duidelijk dat er geen extra ongerief is inherent aan de foklijnen van transgene muizen.
12. De integriteit van de dieren wordt aangetast in die zin dat ze als proefdier worden gebruikt en worden gedood. Er is geen andere aantasting van de integriteit van het dier.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlagen goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Het gaat om lage percentages en de criteria zijn duidelijk geformuleerd en door de DEC passend bevonden.
- 3V's
14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn voor het bestuderen fibrotische aandoeningen. Dit heeft te maken met de complexiteit van deze aandoeningen. De DEC ziet in dat met name het afweersysteem

van een levend organisme op dit moment nog niet nagebootst kan worden. De DEC neemt mee in haar weging dat de vergunninghouder ook een onderzoeksprogramma heeft op het gebied van *in vitro*-modellen. Ook beschrijft de aanvrager in de strategie dat geschikte targets geïdentificeerd worden op basis van bijvoorbeeld literatuur, humane studies en/of *in vitro*-testen. Vervolgens wordt voor het valideren of modificatie van het target inderdaad tot verandering van pathologie kan leiden gebruik gemaakt van *in vitro* testen, *ex vivo* testen met humaan weefsel, naast het gebruik van *in vivo* testen in transgene dieren. Daarmee is het voor de DEC helder dat het gebruik van dieren het moment is dat er geen alternatieven zijn zonder dieren. De DEC vertrouwt erop dat de IvD hierop op experimentniveau zal toezien.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat op grond van literatuur en statistiek. 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. Deze strategie bestaat uit het raadplegen van erkende statistische berekeningsmethoden en het combineren van meerdere modellen in dieren. In de bijlagen 1 en 2 laat de aanvrager zien alert te zijn op mogelijkheden voor vermindering. Bijlage 1: in het verleden zijn uitleesparameters verminderd, waardoor de groepsgrootte verkleind kon worden. Bijlage 2: door een andere anesthesiemethode kon de uitval worden verminderd (waardoor minder dieren nodig zijn voor betrouwbare uitkomsten). In het antwoord op vraag 9 van de DEC bevestigt de aanvrager dat men op de hoogte is van de gevolgen van het stellen van eisen aan de power van het experiment, namelijk het gebruik van meer dieren. Maar de DEC is ervan overtuigd dat het gebruik van meer dieren dan ook een sterker resultaat zal genereren, wat extra dierproeven daarna zal kunnen voorkomen.
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, en dat de dierproeven met zo min mogelijk stress en ongerief gepaard gaan. Zo worden er modellen gekozen waarin fibrotische aandoeningen zich relatief snel manifesteren op moleculair-biologisch niveau en krijgen herstellende dieren een warmtematje (bijlage 2). Dit zijn enkele voorbeelden waaruit wij opmaken dat er aantoonbaar aandacht voor verfijning is. Met het antwoord op vraag 6 van de DEC is bovendien duidelijk geworden hoe monitoring van het ongeriefniveau plaatsvindt.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. In de bijlagen staat beschreven hoe soms mannelijke en soms vrouwelijke dieren zullen worden gebruikt, in overleg met de opdrachtgever. De strategie en onderbouwing hierbij vindt de DEC overtuigend. De DEC is er dan ook van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven variërend met mannelijke, dan wel vrouwelijke dieren uit te voeren. Zo wordt in bijlage 1 gekozen voor mannelijke muizen omdat zij sneller longfibrose ontwikkelen dan

vrouwtjes. Bij ratten is het vrouwelijke model gevalideerd, maar is na eventuele validatie van het mannelijke model gebruik van dat model een mogelijkheid.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat het noodzakelijk is voor de te behalen doelen om weefsels van de dode dieren te bestuderen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU-richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel specifieke typen muizen en ratten worden aangevraagd, is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in processen en therapieën bij fibrose-aandoeningen de dood van maximaal 24.000 muizen en maximaal 4.000 ratten, en daarbij voor 10% van de dieren licht ongerief, 89,5% matig ongerief en 0,5% ernstig ongerief?
2. De DEC TNO is van mening dat het maatschappelijk belang van inzicht in processen en therapieën bij fibrose-aandoeningen in dit project zwaarder weegt dan het belang van de proefdieren om niet aan de proeven te worden onderworpen, met bijkomend ongerief. Indien de doelstellingen bereikt worden, wat aannemelijk is, is dat een stap vooruit in de ontwikkeling van betere therapieën ter voorkoming of genezing van fibrose-aandoeningen.
3. De DEC is overtuigd van het belang van het doel, namelijk het verkrijgen van inzicht in fibroseprocessen ten behoeve van de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen fibrose. Door de transleerbaarheid van de mens kan dit project bijdragen aan de ontwikkeling van dergelijke medicijnen. De waarden die voor patiënten in het geding zijn wegen zwaarder dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. De voorgestelde experimentele opzet, in combinatie met de deskundigheid van de uitvoerenden, kan daadwerkelijk bijdragen aan belangrijke gezondheidsdoelen voor menselijke patiënten. Ook heeft de DEC op grond van het projectvoorstel er vertrouwen in dat de aanvrager kan voldoen aan de 3V-voorwaarden.

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, behalve de vragen zoals die gesteld zijn aan de aanvrager. Deze zijn door de aanvrager naar tevredenheid beantwoord.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**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
AVD5010020172207

Bijlagen

2

Datum 16 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 juni 2017. Het gaat om uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5010020172207. 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 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

16 juni 2017

Aanvraagnummer:





AVD5010020172207

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50100
Naam instelling of organisatie: TNO
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 27376655
Postbus: 96800
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG
IBAN: NL39INGB0657819271
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: TNO

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
16 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD5010020172207

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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



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:
Geplande einddatum:
Titel project:

1 januari 2018
31 december 2023
Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen.

Titel niet-technische samenvatting:

Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces in diermodellen

Naam DEC:
Postadres DEC:
E-mailadres DEC:

DEC-TNO
96800 2509 JE DEN HAAG



Betaalgegevens

De leges bedragen:
De leges voldoet u:

€ 1.684,-
na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:

Plaats:

Den Haag

Datum:

16 juni 2017

Datum:

16 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

T.a.v. Accounts Payable

Postbus 96829

2509 JE DEN HAAG



**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

AVD5010020172207

Bijlagen

2

Datum 16 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 juni 2017

Vervaldatum: 16 juli 2017

Factuurnummer: 172207

OVV: Vooruitbetaling, bestelnummer 3100165835/1

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven	€ 1.684,00

Betreft aanvraag AVD5010020172207

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

TNO

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**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
AVD5010020172207

Datum 23 juni 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." met aanvraagnummer AVD5010020172207. 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 de NTS geeft u onder 3.5 aan dat er sprake kan zijn van ernstig ongerief, terwijl in 3.4 staat dat het ongerief maximaal matig is. Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin u onder 3.4 ook aangeeft dat er sprake kan zijn van ernstig ongerief, eventueel voorzien van extra uitleg?

Kunt u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 aangeven waarom u enkel vrouwelijke muizen wilt gebruiken? Kunt u voor Bijlage 3.4.4.4 aangeven welk geslacht ratten u wilt gebruiken en indien dit één geslacht betreft onderbouwen waarom? Als onvoldoende (wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

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.

Datum:

23 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Van: [redacted]
Verzonden: woensdag 5 juli 2017 14:32
Aan: Info-zbo
CC: [redacted]
Onderwerp: RE: Aanhouden AVD5010020172207
Categorieën: Dossier [redacted]

Geachte [redacted],

Naar aanleiding van uw vraagbrief op onze aanvraag AVD5010020172207 "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." hebben wij de onderstaande reactie van de onderzoeker ontvangen:

We hebben alle onduidelijkheden in de aanvraag verwerkt, de aanpassingen zijn rood gemarkeerd in de tekst weergegeven. Een nieuwe NTS en de bijlagen 3.4.4.3 en 3.4.4.4 die bij deze aanvraag horen, zijn aangepast, verduidelijkt en geüpload via NetFTP.

In de NTS geeft u onder 3.5 aan dat er sprake kan zijn van ernstig ongerief, terwijl in 3.4 staat dat het ongerief maximaal matig is. Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin u onder 3.4 ook aangeeft dat er sprake kan zijn van ernstig ongerief, eventueel voorzien van extra uitleg?

- Een nieuwe NTS is geüpload, waarin onder 3.4 in rood de wijzigingen zijn aangegeven.

Kunt u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 aangeven waarom u enkel vrouwelijke muizen wilt gebruiken?

- In Bijlage 3.4.4.3 geven wij aan dat we voornamelijk vrouwelijke muizen willen gebruiken voor huidfibrose studies, omdat het model hierin goed is gevalideerd. Echter kunnen mannelijke muizen ook voor dit type studie gebruikt worden. Een studie om de huidfibrose inductie in de twee geslachten te valideren staat op dit moment ingepland. We hebben de bijlage 3.4.4.3. aangepast om dit te verduidelijken.

Kunt u voor Bijlage 3.4.4.4 aangeven welk geslacht ratten u wilt gebruiken en indien dit één geslacht betreft onderbouwen waarom? Als onvoldoende wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

- In bijlage 3.4.4.4 hebben we onderbouwd welk geslacht ratten we zullen gaan gebruiken als er vraag blijkt te zijn naar leverfibrose studies in ratten. Eerst zal in een validatie studie gekeken worden of de bij muizen waargenomen geslachtsafhankelijke verschillen ook in de rat optreden. Op basis hiervan zal besloten worden of beide geslachten bruikbaar zijn om voor een lever fibrose studie in te zetten.

Nog een algemene opmerking betreffende het gebruik van de verschillende geslachten in deze aanvraag: Hoewel in sommige studies het gebruik van de verschillende geslachten ook door partners afhankelijk is (als er bijvoorbeeld al PK data in vrouwen bekend is, ligt het voor de hand om een studie ook in vrouwen uit te voeren), verwachten wij dat de ratio man/vrouw over de gehele aanvraag met hierin alle vier de fibrose modellen ongeveer gelijk zal zijn.

Als er nog vragen of onduidelijkheden zijn dan hoor ik dat graag

Met vriendelijke groet,

[redacted]

Location

TNO innovation
for life

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the

sender and delete the message. TNO accepts no liability for the content of this e-mail, for the manner in which you use it and for damage of any kind resulting from the risks inherent to the electronic transmission of messages.

From: Info-zbo

[mailto:info@zbo-ccd.nl]

Sent: vrijdag 23 juni 2017 16:46

To: [REDACTED]

Cc: [REDACTED]

Subject: Aanhouden AVD5010020172207

Geachte [REDACTED],

Op 15 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." met aanvraagnummer AVD5010020172207. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op.

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 er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[REDACTED]

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

[REDACTED]

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**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

AVD5010020172207

Bijlagen

1

Datum 10 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." met aanvraagnummer AVD5010020172207. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 5 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS en de onderbouwing voor de te gebruiken geslachten.

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 heeft aangegeven dat over het gehele project de ratio mannelijke en vrouwelijke dieren gelijk zal zijn.

U kunt met uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2023.

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:

10 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-TNO gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

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

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

Bezwaar

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. 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: TNO
Adres: Postbus 96800
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG
Deelnemersnummer: 50100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2023, voor het project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." met aanvraagnummer AVD5010020172207, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-TNO. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Research assistant verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 5 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 juni 2017, ontvangen op 15 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 5 juli 2017

Aanvraagnummer:
AVD5010020172207

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Longfibrose in muis of rat				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	6.000	1% Ernstig 99% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.000	1% Ernstig 99% Matig	
3.4.4.2 Nierfibrose in muis of rat				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	3.000	1% Ernstig 99% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	800	1% Ernstig 99% Matig	
3.4.4.3 Huidfibrose in muis of rat				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	6.000	1% Ernstig 99% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.000	1% Ernstig 99% Matig	
3.4.4.4 Leverfibrose in muis of rat				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	6.000	1% Ernstig 99% Matig	

Aanvraagnummer:
AVD5010020172207

	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.000	1% Ernstig 99% 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 2024 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welke experimenten; welke type dierproef; de wijze van uitvoering; welke diersoort en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 31 januari door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken. Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kan aantonen dat er geen gegevens over de geteste stof kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

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:
AVD5010020172207

Over de hele aanvraag worden mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplusdieren in voorraad moeten worden gedood. De aanvrager mag de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten, bij deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.



Aanvraagnummer:
AVD5010020172207

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 onvereenigbaar 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:
AVD5010020172207

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 W17-12										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20172225	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x						
5	DEC-advies				x		x	x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
8	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
9	Adviesnota CCD		x						x	
10	Beschikking en vergunning				x		x	x		

19 JUN 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

<p>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></p>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen										
<p>1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.</p>	<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										
<p>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></p>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Grooteplein 10</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 Grooteplein 10	Postbus	9101, [redacted]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10										
Postbus	9101, [redacted]										
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen										
IBAN	NL90ABNA0231209983										
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud										
<p>1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Hoogleraar</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[redacted]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[redacted]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Hoogleraar	Afdeling	[redacted]	Telefoonnummer	[redacted]	E-mailadres	[redacted]
(Titel) Naam en voorletters	[redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.										
Functie	Hoogleraar										
Afdeling	[redacted]										
Telefoonnummer	[redacted]										
E-mailadres	[redacted]										
<p>1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres	
(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.										
Functie											
Afdeling											
Telefoonnummer											
E-mailadres											

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input 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 | 14 . 07 . 2017 |
| Einddatum | 14 . 08 . 2019 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Kan extra magnesium de ontwikkeling van problemen aan hart- en vaten bij chronische
- 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 € 1.035,00 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

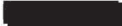

6 Ondertekening

- 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	
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	16 - 06 - 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. | The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment |

2 Categories

- | | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input 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.
-

Cardiovascular disease is the leading cause of death in patients with chronic kidney disease (CKD). Although the prevalence of traditional risk factors, like hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia is high in these patients, these factors account only partially for the high cardiovascular risk. Besides traditional risk factors, kidney specific and also unknown non-traditional risk factors are involved. (1) Vascular calcification and diastolic heart failure are common manifestations of cardiovascular disease in these patients, and are assumed to contribute to this risk.

The role of magnesium in the development of calcification and heart disease has recently gained attention. Magnesium is an inorganic ion that is involved in many enzymatic reactions and influences the passage of other electrolytes across the cell membrane. As a consequence, it is involved in many physiological functions like neuromuscular conductivity and muscle contraction and relaxation, affecting the heart and blood vessels. In non-CKD patients, clinical observational studies have demonstrated associations of lower serum Mg levels with mortality and cardiovascular disease, including coronary calcification, atrial fibrillation and progression of left ventricular hypertrophy. (2-5) Magnesium homeostasis is dependent on renal regulation. As a consequence, patients with decreased renal excretory function of end-stage renal disease tend to have plasma magnesium levels in the upper range of normal (or less frequently even above), and this can be considered protective. Indeed, in patients on dialysis multiple observational studies, including a post-hoc analysis of data from European dialysis patients performed in the VU medical center in Amsterdam, showed that the protective effect on mortality was linear even beyond the upper range of normal for magnesium concentration.(6) Importantly, this study revealed that especially reductions in cardiovascular mortality, including sudden death contributed to this improvement.(6) Apparently, the

optimal range of magnesium levels in dialysis patients is different from the normal range in the healthy population. Moreover, the optimal concentration of magnesium for these patients and patients with less severe stages of renal insufficiency is higher than the concentration that is most frequently present in these patients. These observational data point towards lower magnesium concentration as a novel risk factor for cardiovascular disease in CKD. A possible explanation for a different optimal value in patients with CKD could be a change of binding of other molecules in blood plasma to magnesium, a change of the distribution of magnesium between different body compartment, and a change of the availability of other electrolytes (like calcium and phosphate) that contribute to ectopic calcification. In this situation, a higher magnesium level could offer protection.

Possible biological mechanisms underlying these associations are insufficiently explored. Based on the biological functions of magnesium, with a role in multiple enzymatic reactions and influence on passage of electrolytes across the cell membrane, many protective mechanisms of magnesium that are disturbed in CKD are possible.

Preliminary *in vitro* studies in vascular smooth muscle cells (VSMC) have also linked low magnesium concentrations to vascular calcification. For vascular calcification specifically, multiple protective mechanisms of magnesium have been suggested.

Vascular calcification consists of components that are normally found in bone tissue. In the developmental process of vascular calcification, an extracellular matrix is created of proteins that can also be found in the bone, including collagen and osteonectin. This extracellular matrix is then deposited with hydroxyapatite, which is a mineral of calcium and phosphate ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) thereby resulting in a calcified matrix. The bone-specific matrix proteins are produced by smooth muscle cells in the blood vessel wall that are differentiated towards a bone-like phenotype due to the expression of bone-specific genes. This changed gene expression pattern is induced by an excess of calcification stimulating factors like an increased amount of phosphate. Hydroxyapatite depositing of the extracellular matrix is stimulated by matrix vesicles that are excreted by the bone-like vascular smooth muscle cells and contain calcium, phosphate and enzymes. These matrix vesicles contain an excess of calcium and phosphate and a decreased amount of calcification inhibiting proteins (like MGP) and form a nidus for the formation of hydroxyapatite crystals that subsequently deposit in the extracellular matrix.(7) High calcium and phosphate concentrations, as in chronic kidney disease, are key factors in the calcification process.

Recently, it was shown that in bovine VSMC, Mg^{2+} inhibited b-glycerophosphate-induced calcification.(8) Equally, in unpublished *in vitro* studies in human VSMC, performed at the [REDACTED] of the Radboud University Medical Center, there was complete inhibition of

dihydrogenphosphate-induced calcification in the presence of Mg²⁺ in the surrounding medium. The molecular mechanisms underlying these *in vitro* observations have not been elucidated. Possible modes of action of magnesium include a direct inhibitory effect of extracellular magnesium ions on the formation of calcium-phosphate crystals outside the cell, inhibition of excess calcium influx into smooth muscle cells by inhibition of calcium channels by magnesium, triggering of the calcium-sensing receptor resulting in an unknown molecular mechanisms that inhibits calcification, or intracellular signalling of magnesium towards a calcification inhibitory mechanism for example inhibition of the expression of bone-like genes (by an unknown molecular mechanism). Involvement of reduced activity of the magnesium transporter TRPM7 was shown in rat VSMC with dihydrogen-induced calcification. The mechanism underlying this reduction of TRPM7 activity was unknown. In these cells, inhibition of calcification in the presence of magnesium, was associated with restored TRPM7 activity, and the calcification phenotype was recapitulated again after inhibition of TRPM7 activity by the TRPM7 inhibitor 2-APB.(9)

In addition to the molecular regulation at the cellular level, complex interactions between organs and regulatory mechanisms including hormonal factors are involved in the pathogenesis of cardiovascular complications in CKD. Data from *in vivo* studies, that can take into account these mechanisms, are limited.

One study evaluated the effects of dietary magnesium intake on vascular calcification in a rat model of adenine-induced CKD. In this study, vascular calcification assessed with von Kossa staining and quantitative colorimetric measurement was significantly reduced in animals that were fed a high (0.2%) magnesium diet compared to animals on a low (0.05%) magnesium diet.(10) The mechanisms responsible for this difference between the groups, were unknown.

A major disadvantage of the adenine-induced CKD model is the presence of adenine and its metabolites in the circulation, with potential direct or indirect effects of these substances on the vessel wall and the calcification process. Another frequently used and the longest existing method to induce CKD in animals, is the partial nephrectomy procedure, that selectively targets the kidneys.(11) In this procedure, the functional kidney volume is surgically reduced leading to a research model that resembles chronic kidney disease. This model can be used to study the hypothesis of a causal relationship between lower magnesium intake (and plasma levels), and cardiovascular complications in chronic kidney disease, and explore the pathophysiological mechanisms that may be involved.

If the protective effect of magnesium on cardiovascular complications in CKD, can be confirmed, this offers new perspectives for therapeutic strategies by increasing plasma magnesium levels or directly target the molecular mechanisms involved, with the ultimate goal to decrease cardiovascular disease in patients with CKD.

The hypothesis of this project is that as a result of an increased dietary magnesium content in a rat model of CKD, both the incidence and intensity of vascular calcification (defined as a lower calcium content of the arteries at the end of follow-up) improve and less cardiac hypertrophy (determined as a lower cardiac mass relative to body weight at the end of follow-up) occurs .

1. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*. 2013;382(9889):339-52.
2. Reffelmann T, Ittermann T, Dorr M, Volzke H, Reinthaler M, Petersmann A, et al. Low serum magnesium concentrations predict cardiovascular and all-cause mortality. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):280-4.
3. Hruby A, O'Donnell CJ, Jacques PF, Meigs JB, Hoffmann U, McKeown NM. Magnesium intake is inversely associated with coronary artery calcification: the Framingham Heart Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7(1):59-69.
4. Khan AM, Lubitz SA, Sullivan LM, Sun JX, Levy D, Vasan RS, et al. Low serum magnesium and the development of atrial fibrillation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2013;127(1):33-8.
5. Reffelmann T, Dorr M, Ittermann T, Schwahn C, Volzke H, Ruppert J, et al. Low serum magnesium concentrations predict increase in left ventricular mass over 5 years independently of common cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*. 2010;213(2):563-9.
6. de Roij van Zuijdewijn CL, Grooteman MP, Bots ML, Blankestijn PJ, Steppan S, Buchel J, et al. Serum Magnesium and Sudden Death in European Hemodialysis Patients. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143104.
7. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circulation research*. 2011;109(6):697-711.
8. Kircelli F, Peter ME, Sevinc Ok E, Celenk FG, Yilmaz M, Steppan S, et al. Magnesium reduces calcification in bovine vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(2):514-21.
9. Montezano AC, Zimmerman D, Yusuf H, Burger D, Chignalia AZ, Wadhera V, et al. Vascular smooth muscle cell differentiation to an osteogenic phenotype involves TRPM7 modulation by magnesium. *Hypertension*. 2010;56(3):453-62.
10. Zelt JG, McCabe KM, Svajger B, Barron H, Laverty K, Holden RM, et al. Magnesium Modifies the Impact of Calcitriol Treatment on Vascular Calcification in Experimental Chronic Kidney Disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;355(3):451-62.

11. Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Vascular calcification in animal models of CKD: A review. Am J Nephrol. 2010;31(6):471-81.

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?

In this research project, main objective is to determine if an increased dietary magnesium content improves the incidence and intensity of vascular calcification (part A) and decreases occurrence of cardiac hypertrophy (part B).

In one part (part A), we will study the effects of different dietary magnesium content, on the occurrence and time of initiation and progression of vascular calcification in rats with impaired renal function prone to develop calcification. In the other part (part B), we will study the effects of different dietary magnesium contents, on the occurrence and time of initiation and progression of cardiac remodeling and dysfunction, in rats with decreased renal function.

The specific objectives for part A and B are to answer the following questions:

Part A:

- Objective 1. (Main objective part A) Does a high dietary magnesium decrease the occurrence of vascular calcification in CKD?
- Objective 2. Does a high dietary magnesium retard initiation and progression of vascular calcification in CKD?
- Objective 3. What is the molecular and genetic background of magnesium-related protection against vascular calcification?

Part B:

- Objective 4. (Main objective part B) Does a high dietary magnesium decrease the occurrence and retard initiation and progression of cardiac remodeling (like hypertrophy and fibrosis) and cardiac dysfunction in CKD?
- Objective 5. What is the molecular and genetic background of magnesium-related cardiac protection?

To address these questions, we will use a Sprague-Dawley rat CKD model induced by means of surgical reduction of kidney volume and a phosphate-

enriched diet to promote development of vascular calcification. This is an established animal model for CKD, operational in our institution, and leading to vascular calcification.(11)

Previous studies have also shown that plasma magnesium concentrations in rats can be changed by modulation of dietary magnesium content.(10) Combining the experience and facilities of two academic centers will be complementary in this project. The project will be located partly in the Radboud university medical center and partly in the VU medical center. In the combined centers, there is broad experience with research focusing on molecular mechanisms involved in the transport and effects of ions like magnesium in the context of kidney disease, as well as vast experience in research and techniques focusing on cardiovascular diseases. Also, both centers are qualified and experienced in animal research. For the above mentioned reasons, this project is achievable within the requested time frame.

10. Zelt JG, McCabe KM, Svajger B, Barron H, Lavery K, Holden RM, et al. Magnesium Modifies the Impact of Calcitriol Treatment on Vascular Calcification in Experimental Chronic Kidney Disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;355(3):451-62.

11. Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Vascular calcification in animal models of CKD: A review. *Am J Nephrol.* 2010;31(6):471-81.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

In the renal scientific field, the role of magnesium has been underestimated for a long time. This project will draw attention to the role of magnesium in vascular calcification and CKD. It will offer new insights in the effects and biological mechanisms of magnesium in vascular calcification and the heart in CKD. The results of this project can be the starting point for new translational research focusing on vascular calcification and the role of magnesium. In addition, a future step following this project can be a clinical trial to evaluate the effect of increased plasma magnesium on clinical outcome in patients.

Relevance for renal patients

In The Netherlands over 1 million patients have CKD and over 60,000 patients are suffering from more advanced kidney disease. In 2014, 6463 patients were on dialysis. Yearly, 1 of 6 dialysis patients dies, frequently due to cardiovascular disease.(12, 13) As important as these grim mortality numbers is the high burden of morbidity, hospitalizations and subsequently quality of life due to these cardiovascular complications. If indeed, as hypothesized, magnesium can partially prevent and ameliorate vascular calcification and cardiac remodeling and dysfunction, magnesium balance

can be an attractive therapeutic target to reduce cardiovascular morbidity and increase health and quality of life in patients with CKD. For these patients quality of life and long-term maintenance of health with minimal co-morbidities, has major importance. If magnesium can be increased for instance by individualizing the concentration of magnesium concentration in the dialysate, this could be a simple and cost-effective method to reduce cardiovascular risk in patients dependent on dialysis. Most importantly, also in patients not depending on dialysis magnesium intake can be increased easily, safe, and at low costs. If ultimately proven effective, different ways to supplement magnesium can easily be implemented, as such making this intervention on magnesium feasible for non-dialysis patients too.

Economic relevance

If magnesium inhibits vascular calcification, cardiac remodeling and dysfunction in CKD, and ultimately in future research is proven that cardiovascular complications in CKD can be reduced by external supplementation of magnesium, this therapy can lead to reduction of health care costs since magnesium is inexpensive. The costs of cardiovascular disease are 8.3 billion euros per year in the Netherlands only, taking up 9.2% of total health care budget.⁽¹⁴⁾ Therefore, savings on cardiovascular disease could considerably lower total health care expenses. Additionally, insight in the molecular mechanisms involved, could also facilitate the development of other therapies targeting these calcification regulating mechanisms.

12. www.nierstichting.nl, facts and figures¹³. www.renine.nl/statistics¹⁴. RIVM: www.kostenvanziekte.nl

3.4 Research Strategy

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

This project is designed to elucidate the role of magnesium in the development and progression of cardiovascular disease in the context of chronic kidney disease.

We aim to achieve this by studying the effects of magnesium in an in vivo model of CKD. In a surgical procedure, we will reduce functional kidney tissue (nephrectomy of 3/4 - 5/6 of total kidney tissue) in Sprague Dawley rats, resulting in a model resembling CKD. Since in this model vascular calcifications (VC) develop especially when combined with a phosphate-enriched diet, we will feed the animals a synthetic diet with a high phosphate content, resulting in a model of CKD with its associated vascular calcifications, resembling human CKD-related VC. This model will be used for an experimental set-up with different magnesium conditions resulting from an intervention in dietary magnesium content to get insights into the effects of magnesium on the development of cardiovascular complications in CKD. In addition to VC, also cardiac remodeling and heart failure, typical with diastolic dysfunction, are characteristic for cardiovascular disease in CKD. As outlined previously, the incidence of these pathologies also inversely

correlate with magnesium concentrations in patients with CKD. Therefore, we will also address the effect of magnesium on the development and progression of cardiac remodeling and cardiac dysfunction in this animal model.

To answer the specific research questions, as outlined in paragraph 3.2, we will give diets with either a low or high magnesium content to nephrectomized rats to assess the effects of magnesium on calcification. We will evaluate calcification by analysis of the blood vessels (arteries) at the end of the experiment. To assess if a high magnesium retards the progression of vascular calcification in CKD, we will visualize calcification with imaging techniques (micro-CT) at different time points during follow-up.

To get insight into the underlying mechanisms, in blood samples and vascular tissue we can measure calcification associated factors (proteins and electrolytes) and expression of genes involved in calcification and magnesium transport.

To analyze the effects of magnesium on the heart, an experimental set-up will be used identical to the described set-up for the calcification part of the experiments, that is providing diets with high phosphate and different magnesium content to rats with CKD. We will analyze the influence of dietary magnesium on the heart by serial echocardiography (hypertrophy, function) and at the end of the experiment after sacrifice of the animals by macroscopic (hypertrophy) and histological examination of cardiac remodeling (hypertrophy and fibrosis). Moreover, we will measure markers of heart failure (ANP, BNP) in blood.

To get insights into the molecular mechanisms, we will measure the expression of genes and proteins involved in cardiac remodeling and magnesium transport in heart tissue, and measure cardiac markers of heart failure in blood samples.

Since in observational studies in dialysis patients (described in the background section), a lower plasma magnesium was also associated with sudden death, known to be most frequently a result of heart rhythm disturbances, we will also isolate cardiomyocytes from the living heart at the end of the animal experiment to study the in vitro effects on processes involved in electrical conduction in cardiomyocytes.

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.

Main experiment - Part A – calcification (location Radboudumc Nijmegen)

One week before the experiments start, the rats will arrive at the animal laboratory for acclimatization. Thereafter, the rats will receive a synthetic diet with standard conditions (magnesium 0.22%, normal phosphate) so that the animals can get used to eating a synthetic diet. After one week on the synthetic diet, the rats undergo surgery to reduce functional kidney volume. From this time on, the rats will receive a phosphate enriched

synthetic diet to facilitate development of calcification, and either a low or high magnesium diet. Vascular calcification will be visualized with micro-CT during follow-up, with intervals of at least one week and maximal 8 scans per animal. Blood samples will be collected to measure kidney function and electrolytes including magnesium and phosphate, maximal 3 samples per animal will be collected. Part of the animals will be housed in metabolic cages for 24 hours for collection of urine to measure electrolyte excretion. At the end of the study, the rats will be sacrificed for analysis of organs and tissue, to determine the degree of vascular calcification and factors involved in calcification and magnesium metabolism.

Main experiment - Part B – cardiac remodeling and function (location VU medical center Amsterdam)

For this part, study set-up will be the same as in part A: functional kidney volume will be surgically reduced and the the rats receive a diet with high phosphate content and either low or high magnesium content. During follow-up, echocardiography will be performed to visualize cardiac morphology (e.g. presence of hypertrophy) and function, with intervals of at least 1 week and maximal 8 ultrasonography procedures. Blood samples will be collected for analysis of renal function, electrolytes and cardiac markers (e.g. ANP, BNP). Maximal 3 blood samples per animal will be collected. At the end of the study, the rats will be sacrificed, for analysis of organs and tissues, and from part of the animals isolation of cardiomyocytes also.

Preceding the main experiments, pilot studies will be performed. In the first pilot, different modulations of dietary magnesium will be validated. Rats will receive a diet with either low (0.05%), normal (0.22%) or high (0.48%) magnesium content for 2 weeks. The normal dietary magnesium is included so that we can see if the low and high dietary magnesium exert effects on plasma magnesium levels compared to the normal diet. Blood samples for analysis of plasma magnesium concentration will be taken with intervals, maximal once a week (=maximal 3 samples). We expect the low (0.05%) dietary magnesium to be well tolerated, since this magnesium content is recommended for rat diets by the American Institute for Nutrition.⁽¹⁵⁾ The diet that is normally used for rats in our animal facility contains 0.22% magnesium which is high above the recommended amount. If we would use this diet as comparator of the diet with the high magnesium content in the main experiments, we would expect the difference of effect on primary outcome parameters in the main experiments to be limited since the normal diet already contains more magnesium than needed. Therefore, we also use a diet with lower magnesium content (0.05%) in this pilot, that can be the comparator of the high magnesium diet in the main experiments. We expect to achieve the effect on plasma magnesium within 2 weeks. Therefore, follow-up will initially be 2 weeks in this pilot. Modulation of dietary magnesium could potentially cause hypo- or hypermagnesemia. Only if severe, this might have effects on wellbeing of the animal. Intensive daily monitoring ensures timely recognition of these effects on wellbeing (as described in detail in the "description of animal procedures"). We expect that the tested diets do not cause severe hypo- or hypermagnesemie. If the diets do not effectively modulate plasma

magnesium, or are not tolerated, the pilot is once more repeated with different dietary magnesium content or extended follow-up. In the repeated pilot, follow-up will be maximal 12 weeks and maximal 8 blood samples will be performed with intervals of at least 1 week. In the second pilot, the model of nephrectomy and vascular calcification will be validated in the strain (Sprague-Dawley) used for these experiments. These rats are 5/6-nephrectomized and receive a diet with high phosphate content and low dietary magnesium. As in main experiment part A, vascular calcification will be visualized with micro-CT during follow-up with intervals of at least one week and maximal 8 scans per animal; maximal 8 blood samples will be collected; and at the end of the study, the rats will be sacrificed for analysis of organs and tissue, to determine the degree of vascular calcification. Follow-up (equal to duration of the dietary interventions) in this pilot will initially be 12 weeks. If the model appears not to be representative, the pilot can be repeated once after adaption of protocols based on results of the pilots. In case of ineffective development of vascular calcification, follow-up will be extended to maximal 16 weeks. In case of high animal loss combined with severe renal impairment (rise of creatinine high above 2 times baseline), nephrectomy can be reduced up to 3/4 of kidney volume. In the repeated pilot nephrectomy will be minimal 3/4 and maximal 5/6 of vital kidney volume. In case of unforeseen low prevalence of calcification, the model can be modified by the addition of exogenous calcitriol. Calcitriol is the active form of vitamin D and if added to the model it causes more severe calcification that occurs earlier.(16, 17) Initially, we will not use calcitriol because we only want to perform necessary interventions and induce only as much calcification as is needed in the experiment, so that we do not cause unnecessary animal suffering and also because by inducing more severe calcification it could be more difficult to determine an effect of magnesium.

After the pilots there will be a go / no go moment before proceeding to the main experiments. For proceeding to the main experiments it is required that survival is 70% or above, vascular calcification develops in $\geq 60\%$ of surviving animals and the magnesium diets are well tolerated and have any effect on serum magnesium levels (as is also depicted in figure 1 and 2).

15. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition*. 1993;123(11):1939-51.

16. Henley C, Colloton M, Cattley RC, Shatzen E, Towler DA, Lacey D, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(7):1370-7.

17. Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, et al. The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int*. 2008;73(3):300-7.

Project time-line

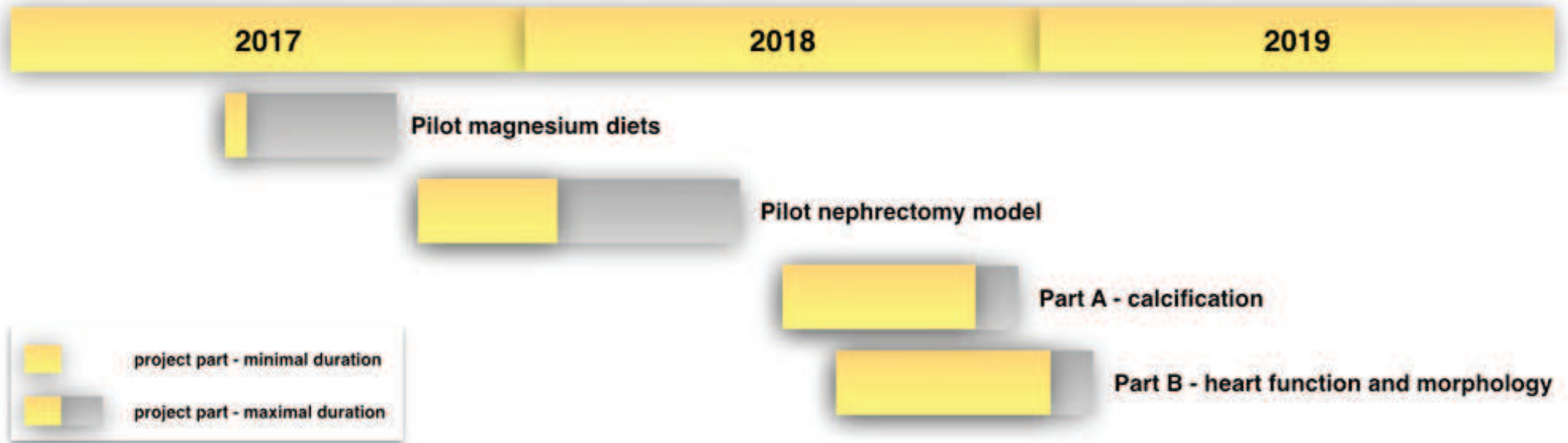


Figure 1. Pilot magnesium diets

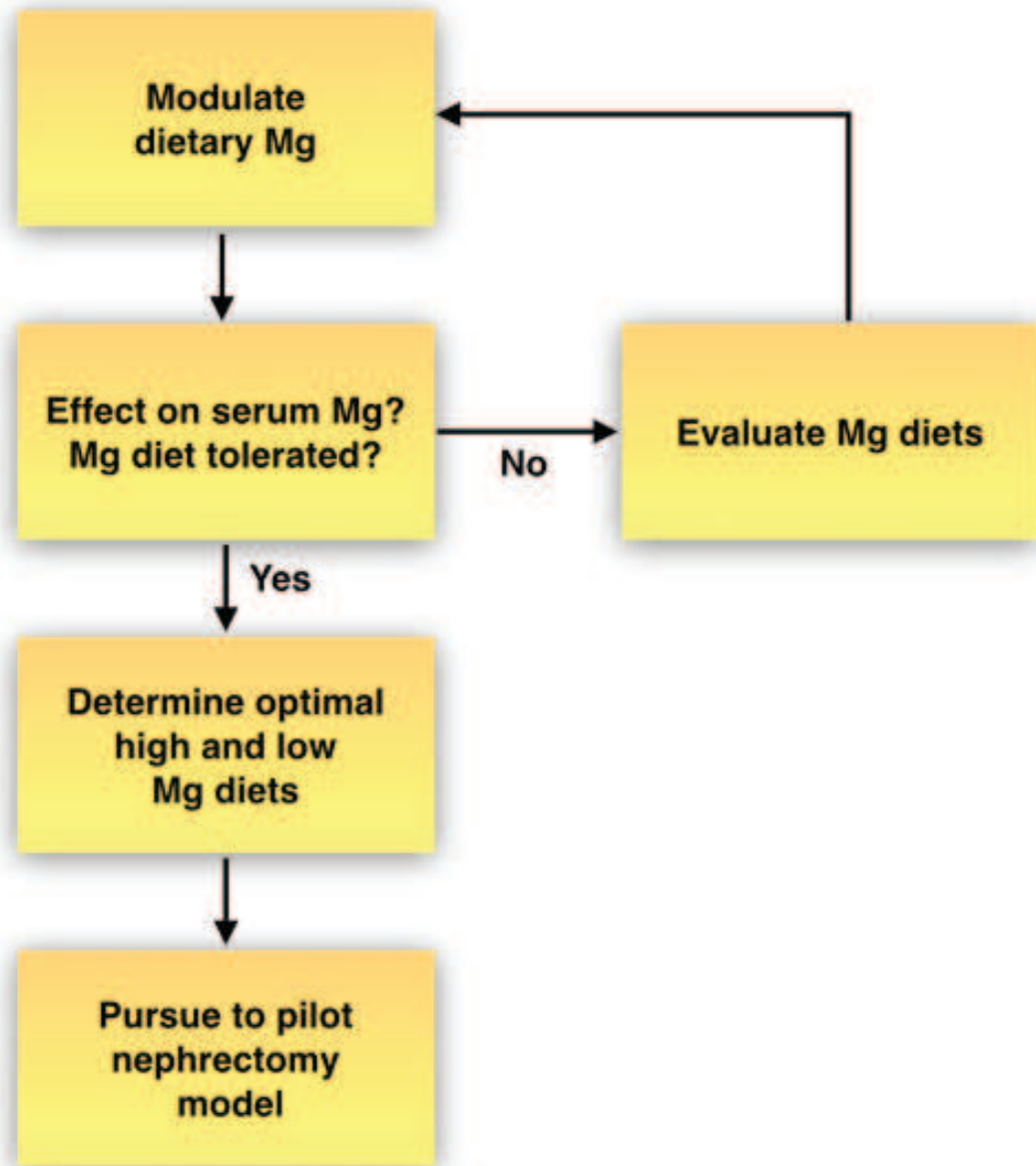


Figure 2. Pilot model nephrectomy + calcification

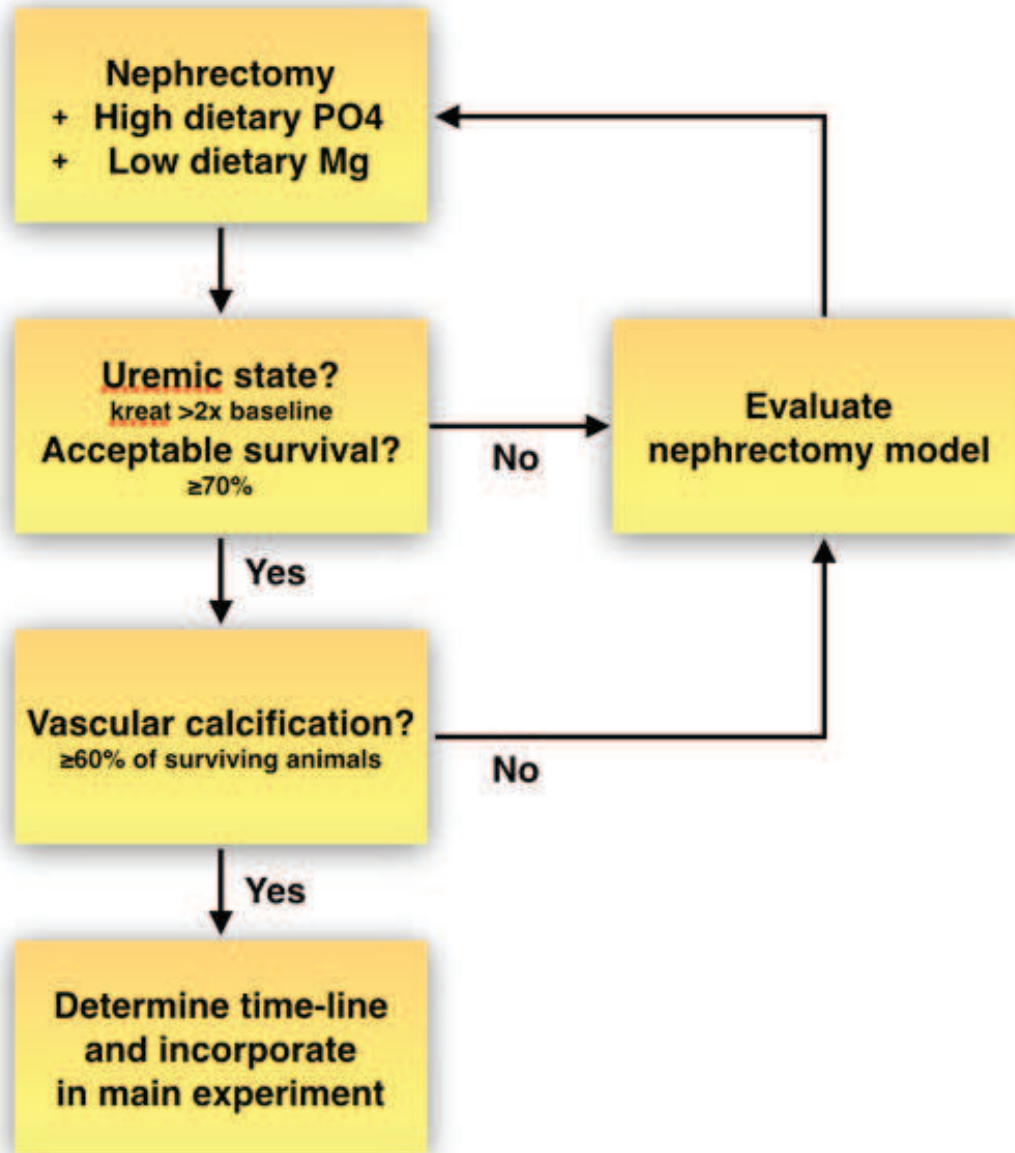
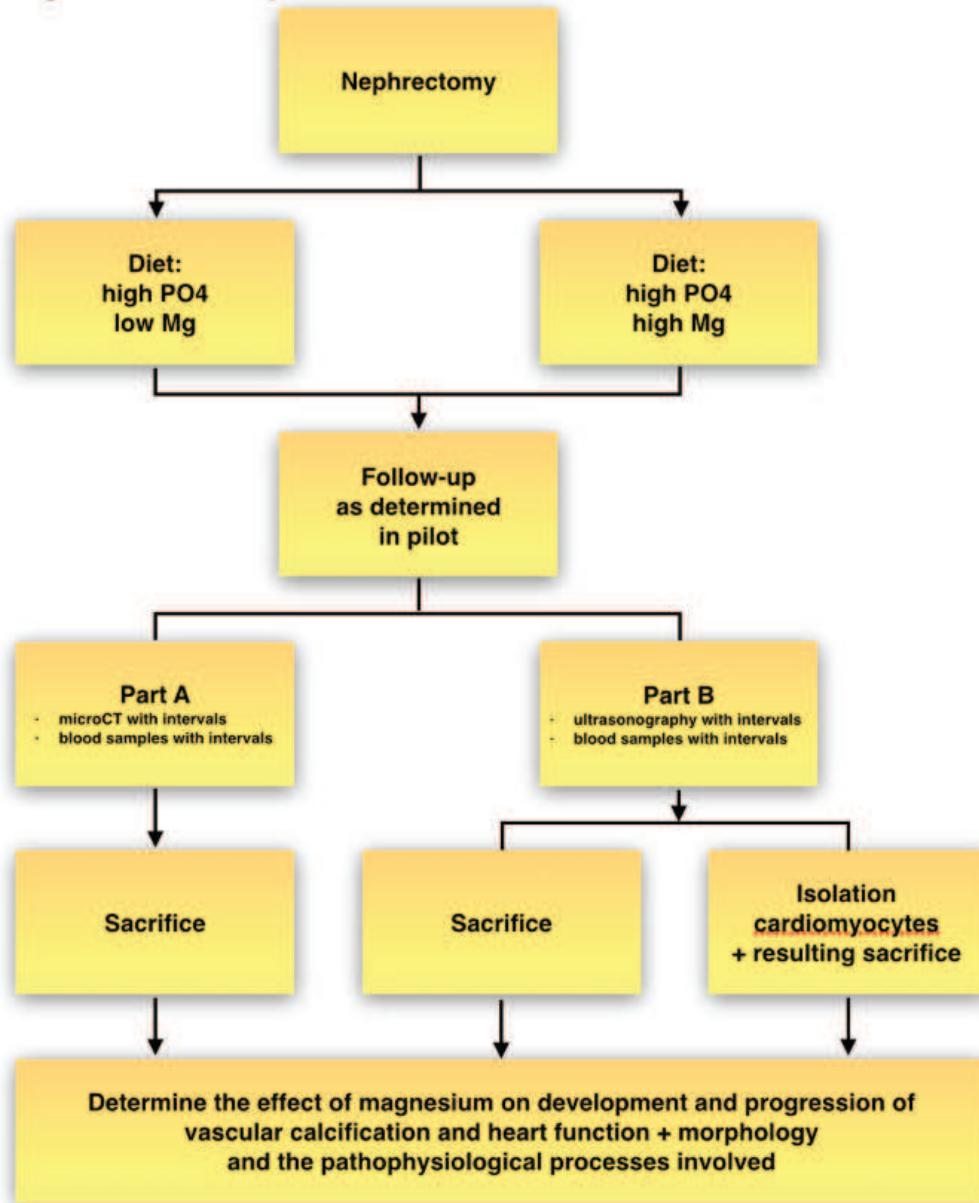


Figure 3. Main experiment



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

To elucidate the role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal insufficiency, we will study these effects in an animal model of chronic kidney disease. As cardiovascular disease in CKD comprises vascular calcifications as well as cardiac remodeling and dysfunction, the experiments will investigate both the effects on the vasculature and the heart. The experiment will be conducted at two academic centers, thus combining available expertise and facilities of these centers. Part A focuses on vascular calcification and is conducted at the Radboud university medical center. At this center, micro-CT facility and expertise is available that enables us to visualize vascular calcification at different time points during follow-up so that effects on progression of calcification can be studied. Part B focuses on cardiac remodeling and dysfunction and is conducted at the VU medical center. This center is experienced in cardiac ultrasonography, cardiac research and isolation and analysis of cardiomyocytes from rat hearts. It is only possible to perform all parts of the experiment by locating the parts at two academic centers. Micro-CT is only available at the Radboudumc and cannot be transported to the VUMC. Isolation of primary cardiomyocytes requires equipment and a large training effort to enable well-running procedures performed by an experienced team and can therefore not be implemented at the Radboudumc for this project. By combining these parts, the effects of magnesium on both the vascular and cardiac problems that occur in CKD, can be investigated. The results of both parts can be linked together further, by analysis of the organs after sacrifice: in the rats from part A (calcification) the cardiac effects can be examined in the heart, and in the rats from part B (focusses on the heart) the arteries can be examined for vascular calcification.

Before proceeding to the main experiments, pilots will be performed to determine significant and tolerable modulations of dietary magnesium, and optimize the model of CKD with associated calcifications and its time-line. The results of the pilots are essential milestones to optimize study set-up of the main experiment. The pilot with different magnesium diets will be performed first, so that for the pilot with the nephrectomy model the optimal dietary magnesium content is known. Milestones and selection points are visualized in figure 1 to 3 in paragraph 3.4.2.

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	Reduction of functional kidney volume + high dietary phosphate + different dietary magnesium, with measurements of vascular calcification and cardiac morphology and function

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 data-bbox="616 798 795 833">Serial number</th> <th data-bbox="1355 798 2083 833">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="616 833 795 954">1</td> <td data-bbox="1355 833 2083 954">Reduction of functional kidney volume + high dietary phosphate + different dietary magnesium, with measurements of vascular calcification and cardiac morphology and function</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Reduction of functional kidney volume + high dietary phosphate + different dietary magnesium, with measurements of vascular calcification and cardiac morphology and function
Serial number	Type of animal procedure					
1	Reduction of functional kidney volume + high dietary phosphate + different dietary magnesium, with measurements of vascular calcification and cardiac morphology and function					

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 a surgical procedure, the volume of vital kidney tissue is reduced, which results in impaired renal function and results in an (already established) animal model for chronic kidney disease. An increased dietary phosphate content post-nephrectomy, will induce development of vascular calcifications as is seen in human chronic kidney disease. This will provide a model of CKD with the associated complications on the vasculature and heart. Using this model, we can study the effects of supplemental magnesium (provided in the diet) on the development and progression of vascular calcification and cardiac remodeling and dysfunction.

The objectives are to answer the following research questions:

Part A (calcification):

Objective 1. Does a high dietary magnesium decrease the occurrence of vascular calcification in CKD?

Objective 2. Does a high dietary magnesium retard initiation and progression of vascular calcification in CKD?

Objective 3. What is the molecular and genetic background of magnesium-related protection against vascular calcification?

Part B:

Objective 4. Does a high dietary magnesium decrease the occurrence and retard initiation and progression of cardiac remodeling (like hypertrophy and fibrosis) and cardiac dysfunction in CKD?

Objective 5. What is the molecular and genetic background of magnesium-related cardiac protection?

Primary outcome parameters to measure the effects in this study are:

- vascular calcification assessed by colorimetric measurements of calcium content in vascular tissue. *(for objective 1)*
- cardiac hypertrophy expressed as cardiac mass relative to body weight. *(for objective 4)*

Secondary outcome parameters are:

- vascular calcification assessed during follow-up by microCT, and in vascular tissue by stainings. *(for objective 1 and 2)*

- cardiac remodeling assessed with echocardiography (parameters include ventricular wall thickness; left ventricular mass index) and with histology of heart tissue (parameters include wall thickness and fibrosis). (*for objective 4*)
- cardiac dysfunction assessed with echocardiography (parameters include left ventricular ejection fraction and measures of diastolic dysfunction) (*for objective 4*)
- expression of genes and proteins involved in the calcification process (*for objective 3*) and cardiac remodeling (*for objective 5*)

Other parameters include:

- parameters of kidney function (kreatinine, ureum in plasma) to validate the model of impaired kidney function
- plasma magnesium to validate the effect of modulation of dietary magnesium

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

Pilot: magnesium diets:

To determine the optimal low and high dietary magnesium content for the main experiments, in a pilot study, the rats will be divided in different groups that receive diets with either a low (0.05%), normal (0.22%) or high (0.48%) dietary magnesium for 2 weeks. The normal dietary magnesium is included so that we can see if the low and high dietary magnesium exert effects on plasma magnesium levels compared to the normal diet. Blood samples are taken from the tail vein with use of a restrainer and with intervals of at least 1 week (=maximal 3 samples). We expect the low (0.05%) dietary magnesium to be well tolerated, since this magnesium content is recommended for rat diets by the American Institute for Nutrition. We expect to achieve effect on plasma magnesium within 2 weeks. Therefore, follow-up will initially be 2 weeks in this pilot. If the diets do not effectively modulate plasma magnesium, or are not tolerated (cause symptoms of hypo- or hypermagnesemia or unforeseen mortality, as described in paragraph I), the pilot will be expanded using different dietary magnesium content or extended follow-up. In the expanded pilot, follow-up will be maximal 12 weeks and maximal 8 blood samples will be performed with intervals of at least 1 week.

Pilot: nephrectomy model:

In a surgical procedure under general anaesthesia, functional kidney tissue is reduced. Initially, this reduction will be 5/6 of total kidney tissue. First, the left kidney is exposed and decapsulated and one or more branches of the left renal artery are ligated to induce infarction of 2/3 of this kidney. Second, the right kidney is exposed, decapsulated, and after ligation of the hilar structures (artery, vein and ureter) removed in total in the same procedure. The surgery will be performed under general anaesthesia, including treatment with narcotics and analgesics, according to standard and

validated protocols used within our animal facility. This protocol also covers analgesia during post-surgical recovery. The animals receive a phosphate enriched diet (1.2%) with a low magnesium content as optimized in the preceding pilot study that determined the optimal magnesium diets. To determine development and progression of vascular calcification, micro-CT scans are performed under anaesthesia with intervals of at least 1 week and maximal 8 scans per animal. Maximal 8 blood samples will be collected from the tail artery with intervals of at least 1 week, for measurements of kidney function. At the end of the study, the rats will be sacrificed under general anaesthesia for analysis of organs and tissue. Initially follow-up (including dietary intervention) after nephrectomy will be 12 weeks.

If the model appears not to be representative, the pilot can be repeated once after adaption of protocols based on results of the pilots. In case of ineffective development of vascular calcification, follow-up will be extended to maximal 16 weeks. Initially we will perform 5/6-nephrectomy since combined with a high phosphate diet this is the established model for chronic kidney disease with associated vascular calcification in literature. However, in case of high animal loss combined with severe renal impairment (rise of kreatinine substantially above 2 times baseline), nephrectomy can be reduced up to 3/4 of kidney volume. In the repeated pilot nephrectomy will be minimal 3/4 and maximal 5/6 of vital kidney volume.

Main experiment

Rats are nephrectomised as validated in the pilot. Starting from this time on, the animals will receive a phosphate enriched diet (1.2%) with either a low or high magnesium content (as optimized in the pilot) until the end of the experiment.

Part A of main experiment

In this part, micro-CT scan are performed with intervals of at least one week and maximal 8 scans to determine moment of initiation, severity and progression of vascular calcification during follow-up. Blood samples will be collected at intervals of at least one week and maximal 3 times to confirm effective reduction of kidney function and determine plasma magnesium values. Duration of follow-up is as optimized in the pilot of the nephrectomy model and will be maximal 16 weeks. Halfway follow-up time, part of the animals will be housed in metabolic cages for collection of urine to measure electrolyte excretion. At the end of the experiments the animals are sacrificed under general anaesthesia and organs and tissue are collected for further analysis.

Part B of main experiment

In this part, echocardiography is performed with intervals of at least one week and maximal 8 times to determine the initiation, severity and progression of cardiac remodelling and dysfunction. Blood samples will be collected at intervals of at least one week and maximal 3 times to confirm effective reduction of kidney function, and determine plasma magnesium values and parameters of cardiac dysfunction (like ANP, BNP). Duration of

follow-up is as optimized in the pilot of the nephrectomy model and will be maximal 16 weeks. For isolation of vital cardiomyocytes using the Langendorff heart preparation, from part of the animals the heart is excised from the living animal after applying adequate anaesthesia. The diaphragm is opened via abdominal incision to expose the thoracic cavity, after which the thoracic cavity is opened by reflecting the thoracic cage upwards after bilateral incision of the thorax. The heart is excised by cutting the aorta, vena cava and pulmonary veins. This procedure will result in abrupt termination of circulation resulting in death. The other animals are sacrificed at the end of the experiment by means of a standard procedure for euthanasia under general anaesthesia. From all animals, organs and tissues are collected 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.

In the pilot study for modulation of magnesium diets, a small number of animals will be used to test if the diets are tolerated and if this induces a sufficient effect on plasma magnesium levels. There are no available data on plasma magnesium levels in 5/6-nephrectomized rats. Mean plasma magnesium level in literature is $0.75 \text{ mmol/mL} \pm 0.04 \text{ mmol/L}$ in healthy Sprague-Dawley rats on a 0.05% magnesium diet.(1) A sufficient increase is defined as a rise in plasma magnesium concentration of 0.1 mmol/L , since in clinical observational studies differences of this magnitude were associated with improved outcome. Based on these data and definitions, and setting significance level at 5% ($\alpha=0.05$) and a power of 80% ($\beta=0.80$), the estimated number of animals is 3 per group. For the three diet groups this will be 9 animals in total. If the results give indication for evaluation of different magnesium diets, the pilot will be extended and 18 rats in total can be required.

In the pilot study for validation and characterization of the nephrectomy model with vascular calcification, also the smallest possible number of animals will be used. As is characteristic for a pilot study, detailed information for sample size calculations (for determination of progression and timeline of calcification) is not available in literature. We assume 3 animals would be an appropriate number to study the timeline of vascular calcification. On average, 60% of successfully 5/6-nephrectomized animals on a high phosphate diet develop vascular calcification.(2-4) Based on this, the required number of successfully 5/6-nephrectomized rats in the experiment would be 5 ($3 / 0.6 = 5$).

From previous research in multiple research lines in the VUMC we know that success ratio for the nephrectomy is 80%. For this model, that is an acceptable result. Due to anatomical differences between animals and the complexity of the surgical procedure, unfortunately it has not been possible to achieve a higher success ratio. Mortality in literature after 5/6-nephrectomy in rats on a high phosphate diet was 30-46% in studies that mentioned mortality,(3, 5, 6) but other studies did not describe mortality.(2, 4, 7-10) Based on a success ratio of 70-80% of the surgical procedure, a compensation of 30% is required when this model is used. This results in 8 animals needed for this pilot study ($5 / 0.7 = 7,14 = 8$ animals). If the results of the pilot give indication for adaptation of the model, the pilot study will be expanded and 16 rats in total will be required for the pilot of the

nephrectomy model. To ensure that there are enough animals for the pilot study, 3 extra animals are added to this calculation for the transfer of nephrectomy skills from the animal care facility of the VUmc to the Radboudumc, so 19 rats in total can be required for this pilot study.

For the main experiments in part A, the sample size calculation is based on the primary outcome vascular calcification determined with colorimetric quantification of calcium content. Based on literature, in 5/6-nephrectomized Sprague-Dawley rats on a high phosphate diet we expect a calcium content of $1.8 \text{ ug / mg} \pm 0.3 \text{ ug / mg}$ dry weight in this group (including both the rats that developed and the rats that did not develop vascular calcification).⁽⁹⁾ We consider a 15% decline of calcium content to 1.5 ug / mg dry weight in the group with the high magnesium diet a relevant reduction. Setting significance level at 5% ($\alpha=0.05$) and with a power of 80% ($\beta= 0.80$), the estimated number of animals is 16 per group. Including the compensation of 30% for success ratio of the surgery (as described above) the number of animals per group is 23 ($16 / 0.7 = 22.86 = 23$ animals). For the groups with low and high magnesium diets, the total number is 46 animals.

For the main experiments in part B, sample size calculation is based on the primary outcome heart weight, expressed as cardiac mass relative to body weight. Heart to body weight ratio in Sprague-Dawley rats 12 weeks after nephrectomy is 5.8 mg/g in literature, with a standard deviation of 0.9 mg/g .⁽¹¹⁾ We consider a 20% decline of heart to body weight ratio in the high magnesium group relevant. Based on these values and setting significance level at 5% ($\alpha=0.05$) and with a power of 80% ($\beta= 0.80$), the estimated number of animals is 9 per group. Additionally, to be able to perform the in vitro experiments, we need four animals per group for isolation of vital cardiomyocytes. It is not possible to examine the other cardiac outcome parameters in the animals that are used for isolation of cardiomyocytes because the entire heart will be used in this procedure. Including the compensation of 30% for success ratio of the surgery (as described above) the number of animals per group is 19 ($(9+4) / 0.7 = 18.57 = 19$ animals). For the groups with low and high magnesium diets, the total number needed is 38 animals in this part of the study.

The sample size calculations for the main experiments will be re-evaluated after the pilot studies. If less animals can be used based on the results of the pilot studies, the numbers of animals will be decreased accordingly.

Table 1. Experimental groups and number of animals required.

	Magnesium diet			Renal status		Number of animals	Discomfort level
	Low	Normal	High	Normal	Nephrectomy		
Pilot study magnesium diets	X			X		6	mild
		X		X		6	mild
			X	X		6	mild
Pilot study nephrectomy model	X				X	19	moderate
Main experiment part A	X				X	23	moderate
			X		X	23	moderate
Main experiment part B	X				X	19	moderate
			X		X	19	moderate
Total						121	

1. Takemoto S, Yamamoto A, Tomonaga S, Funaba M, Matsui T. Magnesium deficiency induces the emergence of mast cells in the liver of rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2013;59(6):560-3.
2. Shibata M, Shigematsu T, Hatamura I, Saji F, Mune S, Kunimoto K, et al. Reduced expression of perlecan in the aorta of secondary hyperparathyroidism model rats with medial calcification. *Renal failure*. 2010;32(2):214-23.
3. Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Koiwa F, Saji F, Shiizaki K, et al. Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):911-6.
4. Yao L, Sun YT, Sun W, Xu TH, Ren C, Fan X, et al. High phosphorus level leads to aortic calcification via beta-catenin in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2015;41(1):28-36.
5. Wu-Wong JR, Chen YW, Wong JT, Wessale JL. Preclinical studies of VS-505: a non-absorbable highly effective phosphate binder. *British journal of pharmacology*. 2016;173(14):2278-89.
6. Eraranta A, Tormanen S, Koobi P, Vehmas TI, Lakkisto P, Tikkanen I, et al. Phosphate binding reduces aortic angiotensin-converting enzyme and enhances nitric oxide bioactivity in experimental renal insufficiency. *Am J Nephrol*. 2014;39(5):400-8.
7. Du Y, Wang Y, Wang L, Liu B, Tian Q, Liu CJ, et al. Cartilage oligomeric matrix protein inhibits vascular smooth muscle calcification by interacting with bone morphogenetic protein-2. *Circulation research*. 2011;108(8):917-28.

8. Ferrari GO, Ferreira JC, Cavallari RT, Neves KR, dos Reis LM, Dominguez WV, et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. *BMC nephrology*. 2014;15:69.
9. Martin-Pardillos A, Sosa C, Millan A, Sorribas V. Effect of water fluoridation on the development of medial vascular calcification in uremic rats. *Toxicology*. 2014;318:40-50.
10. Scheiber D, Veulemans V, Horn P, Chatrou ML, Potthoff SA, Kelm M, et al. High-Dose Menaquinone-7 Supplementation Reduces Cardiovascular Calcification in a Murine Model of Extraosseous Calcification. *Nutrients*. 2015;7(8):6991-7011.
11. Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Gross ML. Calcitriol ameliorates capillary deficit and fibrosis of the heart in subtotaly nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(3):778-87.

B. The animals

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

For the experiments, we plan to use adult Sprague-Dawley rats of both sexes, from an experienced, qualified and controlled supplier. These rats are widely used in renal and physiological research. The nephrectomy model with associated calcification is a well-established model in literature especially in these rats. This provides opportunity to compare the results of our experiments with research of others. In the VUmc, we have vast experience with research involving rats and 5/6- and 3/4-nephrectomies. Moreover, available research has shown that dietary magnesium intake can effectively influence plasma magnesium levels in rats. (1,2) The estimated total number of animals required is 121, as described in the previous paragraph.

1. Zelt JG, McCabe KM, Svajger B, Barron H, Laverty K, Holden RM, et al. Magnesium Modifies the Impact of Calcitriol Treatment on Vascular Calcification in Experimental Chronic Kidney Disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;355(3):451-62.
2. Takemoto S, Yamamoto A, Tomonaga S, Funaba M, Matsui T. Magnesium deficiency induces the emergence of mast cells in the liver of rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2013;59(6):560-3.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	Commercial supplier	121	Adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

C. Re-use

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

In a rat model of CKD, the role of magnesium can be investigated in the context of the complex interactions between chronic kidney disease and the cardiovascular system. These experiments can provide a link between the results of clinical observational studies and *in vitro* experiments. The simple *in vitro* conditions of vascular calcification in vascular smooth muscle cells or effects on cardiomyocyte cell lines, can provide valuable additional information on the molecular level, and for this purpose we can isolate primary cardiomyocytes from the rats, that can be used for *in vitro* studies, instead of available cardiomyocyte cell lines that have lost many of the cardiomyocyte specific characteristics. However, these *in vitro* studies cannot reproduce all complex interactions and regulatory mechanisms encountered *in vivo*. Therefore, there is no substitute for animal studies that can take into account this complicated interplay of organ systems, in which regulatory mechanisms including hormonal regulations play a crucial role. Moreover, these interactions cannot be mimicked in a lower animal species. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in human, including analysis of organs and tissue, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address.

Reduction

A sample size calculation will be performed to determine the amount of animals needed, to be able to observe if a difference between the groups

exists that we have defined as relevant, with a defined statistical significance and power. These calculations are previously described in section A3 "statistical methods".

Also, a pilot study will be performed to provide data on the effect of dietary magnesium content on plasma magnesium levels and development of adverse effects, so that the number of animals suffering from extremely low or high magnesium levels can be limited. Based on the calculations, the minimum number of animals will be used for our experiments.

Refinement

The nephrectomy model is a well-established model of CKD, and if combined with a high phosphate diet in rats it is a well-established model of CKD-associated vascular calcification also. In our centers, experience with this procedure is available. The experimental design ensures that the experiments will be conducted in such a way that there are no unnecessary harmful effects on animal welfare. Pilot experiments will provide information to optimize follow-up time and the interval of measurements, so that the animals will be no longer and no more than necessary exposed to the interventions and procedures. Pilot studies and extensive study of available research, will limit the risk of severe unexpected side-effects during the experiments. To limit discomfort, the rats will be housed together in groups as in their natural environment, and with free access to food and water. Only a small number of rats will be housed solitary in metabolic cages for a short duration (maximal 24 hours) to collect urine to measure electrolyte excretion. After nephrectomy, the feeding will be mixed with water and placed in the cages to minimize the effort needed for eating. Post-surgery, the animals will be checked daily to ensure that recovery develops as expected. Follow-up interventions other than the dietary modulation will only be performed after a minimum of 7 days after surgery, to prevent interference with recovery. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, rats will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. In addition, prior to imaging procedures, surgery and sacrifice, the animals will be anaesthetized, and intervals in-between imaging procedures will be at least one week.

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

Refined methods are used, as described before in the concerning paragraph, to limit the risk of adverse effects on animal welfare. Despite this, adverse effects on animal welfare may occur. Therefore, the animals will be closely monitored to ensure timely recognition of declined wellbeing. In the post-operative phase, daily monitoring is performed to detect animal inconvenience at an early stage and act accordingly to minimize suffering. Additional medication for pain relief will be administered according to routine procedures. Using our standardized scoring methods, various parameters of animal welfare, including post-operative recovery and pain relief, physical activity, appearance and body weight, are daily monitored

during the experiments. Extensive weight loss, or pain and suffering that cannot be solved within reasonable time and thus will exceed the predicted discomfort level, will result in implementation of the human endpoint. No other effects on the environment are expected.

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.

Housing will be according to regulations and standard procedures. The animals will be housed in groups as is according to their natural environment. Only if post-surgical recovery in the neprectomy-model pilot study appears to be compromised by other animals causing damage to stiches, the animals can be housed solitary overnight after surgery. In previous experiments with nephrectomy in rats performed in the VUMC, animals were routinely solitary housed overnight after surgery to prevent damage to stiches caused by other animals. However, as was also mentioned by the animal welfare officer of the Radboudumc, grouped housing is preferable wherever possible to reduce stress to the animals. Therefore, the animals will be housed in groups in the nephectomy pilot initially and post-surgical individual housing will be implemented for the further experiments only if damage to stiches occurs and is evidently caused by other animals. During part A of the experiment, some of the animals (5 per group, 10 animals in total) will be housed in metabolic cages for a short time (maximal 24 hours) so that we are able to measure electrolyte excretion. In this way, we

can determine if the effect of the high phosphate diet on phosphate metabolism is the same in the group with the high magnesium diet and the group with the low magnesium diet. If there would be a difference between the groups, we can then distinguish effects of phosphate metabolism and magnesium diet in the data analysis.

Diets will be adapted to create a study set-up for the specific research aims. The rats will receive a synthetic diet with high phosphate content and either low or high magnesium content. The high phosphate diet is needed to facilitate the development of vascular calcifications, as known from previous nephrectomy rat models of CKD-induced vascular calcification that are described in literature.(see background section) Different magnesium contents are used since aim of the project is to study the effects of magnesium on the development and progression of vascular calcification and cardiac dysfunction and hypertrophy.

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.

The nephrectomy will be performed under general anaesthesia, including treatment with narcotics and analgesics, according to standard and validated protocols used within our animal facility. This protocol also covers analgesia during post-surgical recovery. All procedures will be performed by qualified and experienced personnel.

Anaesthesia will also be applied for imaging procedures (ultrasonography and micro-CT), to reduce distress and enable imaging without movement artefacts. These imaging procedures are non-invasive and do not cause pain.

To reduce pain and distress from venous punctures for blood sampling, these punctures will be performed during periods of anaesthesia at the time of the imaging procedures wherever possible. Venous punctures with use of a restrainer will only be performed if blood sampling is necessary at other time points.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The nephrectomy surgery will result in reduced renal function. If only a small volume of kidney tissue remains after the operation, this can result in full-blown kidney failure with associated effects on serum composition, hemoglobin levels and mineral and bone metabolism, which could have adverse effects on welfare. In previous studies in the VUMC, we did not experience side effects of decreased renal function. Apparently, the remaining kidney function is sufficient for animals to survive without compromising their welfare. By providing a diet with high phosphate content, development of cardiovascular disease is promoted, which may become symptomatic and reduce animal welfare, but early stages of calcification can be without effects on wellbeing. Cardiovascular disease is the subject of study and therefore inevitable in the experiments.

Mortality risk is increased as a result of surgery associated mortality and CKD-associated mortality. Reported mortality risk in the 5/6-nephrectomy model in rats with a dietary phosphate above 1%, was 30-46% in studies that mentioned mortality.(1-3) Other studies did not report mortality.(4-9) From previous research in multiple lines of research in the VUMC we know that we can achieve a success ratio for the nephrectomy of 80%. For this model, that is an acceptable result. Due to anatomical differences between animals and the complexity of the surgical procedure, unfortunately it has not been possible to achieve a higher success rate.

For analgesia in the peri-operative period, opiates are used since NSAIDs are contra-indicated because of their side-effects that can compromise the remaining kidney function. Possible side-effects of opiates are nausea and constipation that can be minimized by optimal dosing.

The intervention in dietary magnesium content could cause adverse effects, only if resulting in severe hypomagnesemia or hypermagnesemia. Potential symptoms of hypomagnesemia include skin lesions (dermatosis of hypomagnaesemic rats), neuromuscular manifestations (eg. muscle cramps, convulsions, weakness), cardiovascular manifestations (eg. cardiac arrhythmias, hypertension), bone abnormalities (decreased skeletal growth and increased skeletal fragility) and mortality due to the mentioned disorders. Severe hypermagnesemia could potentially cause neuromuscular effects (eg. muscle weakness), cardiovascular effects (eg. hypotension, bradycardia, complete heart block and death), and bone abnormalities (osteodystrophy). No discomfort is expected in moderate hypo- or hypermagnesemia.

Housing in metabolic cages can cause stress. In the experiment the duration of housing in metabolic cages is limited to maximal 24 hours.

Echocardiography and micro-CT are non-invasive techniques that are not expected to cause side effects other than discomfort during the procedure if it would not be performed under anaesthesia. Radiation exposure with micro-CT scans is limited and does not cause adverse effects if appropriately dosed: X-ray loading to the animal is <1Gy per scan.

Venous punctures for blood collection, might cause hematoma. The volume and frequency of blood collection will be appropriate so that blood collection does not cause hypovolemia or anemia.

1. Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Koiwa F, Saji F, Shiizaki K, et al. Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):911-6.
2. Eraranta A, Tormanen S, Koobi P, Vehmas TI, Lakkisto P, Tikkanen I, et al. Phosphate binding reduces aortic angiotensin-converting enzyme and enhances nitric oxide bioactivity in experimental renal insufficiency. *Am J Nephrol*. 2014;39(5):400-8.
3. Wu-Wong JR, Chen YW, Wong JT, Wessale JL. Preclinical studies of VS-505: a non-absorbable highly effective phosphate binder. *British journal of pharmacology*. 2016;173(14):2278-89.
4. Shibata M, Shigematsu T, Hatamura I, Saji F, Mune S, Kunimoto K, et al. Reduced expression of perlecan in the aorta of secondary hyperparathyroidism model rats with medial calcification. *Renal failure*. 2010;32(2):214-23.

5. Yao L, Sun YT, Sun W, Xu TH, Ren C, Fan X, et al. High phosphorus level leads to aortic calcification via beta-catenin in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2015;41(1):28-36.
6. Du Y, Wang Y, Wang L, Liu B, Tian Q, Liu CJ, et al. Cartilage oligomeric matrix protein inhibits vascular smooth muscle calcification by interacting with bone morphogenetic protein-2. *Circulation research*. 2011;108(8):917-28.
7. Ferrari GO, Ferreira JC, Cavallari RT, Neves KR, dos Reis LM, Dominguez WV, et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. *BMC nephrology*. 2014;15:69.
8. Martin-Pardillos A, Sosa C, Millan A, Sorribas V. Effect of water fluoridation on the development of medial vascular calcification in uremic rats. *Toxicology*. 2014;318:40-50.
9. Scheiber D, Veulemans V, Horn P, Chatrou ML, Potthoff SA, Kelm M, et al. High-Dose Menaquinone-7 Supplementation Reduces Cardiovascular Calcification in a Murine Model of Extraosseous Calcification. *Nutrients*. 2015;7(8):6991-7011.

Explain why these effects may emerge.

The causes of the effects were explained in the previous section. Summarized:

- Nephrectomy: CKD with associated disorders, mortality
- Analgesia: nausea, constipation
- Modulations dietary magnesium: symptomatic hypo- or hypermagnesemia
- Metabolic cages: stress
- Imaging procedures: no effects if appropriately performed
- Venous puncture: hematoma

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

Nephrectomy

In the VUmc via extensive training of the technical skills and the method to reduce kidney volume, a broad experience is gained to perform the nephrectomy procedure in rats in the best possible way. Use of precise instruments and a surgical microscope provide tools for optimal performance. In the animal facility of the Radboudumc, there is also experience with nephrectomy in mice. To ensure that all personnel is well skilled in performing

the nephrectomy specifically in rats, personnel of the VUMC will share their experience and the technical skills with the personnel of the Radboudumc and provide training. Only personnel that is well-skilled, will perform the procedure by themselves for experimental purposes.

In the post-operative recovery phase, the animals are closely monitored to make sure that adverse effects on animal welfare are recognized in an early stage and can be acted on accordingly to solve the underlying problem, or implement a human endpoint as appropriate (as described in the paragraph concerning human endpoints).

Analgesia

Opiates are appropriately dosed according to the protocol that is used for the nephrectomy procedure in the VUmc animal care facility and was made with advice from the veterinarian. Appropriate dosing minimizes nausea with increased chewing, and constipation. No sawdust is used on the floor of the cages, so that in case of increased chewing no constipation is caused by eating sawdust.

Modulations dietary magnesium

In a pilot experiment, it will be evaluated which high and low magnesium concentrations are tolerated. During this pilot experiment the rats will be closely monitored visually and by measurement of serum magnesium concentrations. Rats with symptomatic hypo- or hypermagnesaemia, will be excluded in a timely manner. The results of this pilot experiment will enable us to perform the main study with low and high magnesium concentrations that are generally not causing severe symptoms.

Housing in metabolic cages

Metabolic cages will be used for part of the animals of experiment A and for a short time only, maximal 24 hours. To limit stress from solitary housing, the cages will be placed in a room with other rat cages. Housing in metabolic cages will be performed halfway follow-up time and not shortly before or after other interventions.

Imaging procedures: micro-CT and echocardiography

To reduce discomfort (and facilitate visualization without movement artefacts), anaesthesia will be used for these procedures and will be conducted by properly educated and experienced personnel. To reduce cumulative burden of micro-CT scans, intervals in between micro-CT scans will be at least 1 week.

Venous punctures

As stated previously, volume and frequency of blood collection will be appropriate so that no hypovolemia or anemia is caused. The strategy concerning pain relief was previously mentioned in the section on this topic. The incidence of hematomas is reduced by applying the appropriate technique.

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.

During surgery, individual anatomic variation between animals may result in technical setback in optimal procedure results. These technical difficulties may result in implementation of the humane endpoint, meaning the animal will not recover from anaesthesia and thus no increment in the level of discomfort.

Post-surgery, scoring of specific parameters as described in details below that cannot be resolved and therefore exceed the maximum predicted discomfort level within this project (moderate) will result in implementation of the human endpoint. For the parameter body weight, the human endpoint will be implemented if a decrease of 20% is reached. In these situations, the animal will be sacrificed prematurely according to the recommended methods (as mentioned in section L). In case of doubt, advice of the animal welfare officer will be asked, to provide guidance for follow-up actions.

Setup of the parameters is as follows (these parameters are based on our extensive experience with comparable models and act as a standardized scoring method for individual animal inconvenience):

Bodyweight: no more than 20% loss allowed within a few days compared to top body weight (during recovery the bodyweight during surgery will be used for reference, further on the experiment the top reached bodyweight will count as reference).

Activity scored as active [0], little inactivity [1] or total inactivity/immobility [2].

Appearance scored as normal [0], disturbed fur [1], untended appearance (eyes/nose) [2] or abnormal pose (indication for pain or muscle cramps) [3].

Surgical recovery scored as fully recovered [0], wound closed but visible [1], (small) disturbed wound healing [2] or open wound [3].

The scientific endpoint cannot be achieved prematurely in this experimental set-up, so this is not an applicable reason for implementation of human endpoints during these animals procedures. If the scientific endpoint can no longer be achieved for any reason, implementation of a human endpoint will follow, meaning the nephrectomized rats will be sacrificed prematurely.

Indicate the likely incidence.

Based on previous experience in the VUMC we expect a success rate of the surgical nephrectomy procedure of 80%. From this previous research in different research projects in the VUMC, we know that animals with adverse outcome after surgery generally die spontaneously during surgery or from sudden death thereafter. We did not observe symptoms of decreased kidney function that resulted in a decline of welfare in the animals. As a consequence, implementation of human endpoints is expected to be required infrequently.

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).

Nephrectomy surgery under general anaesthesia: moderate (applicable to 85% of animals)

Synthetic diets with high phosphate: mild (applicable to 85% of animals)

Synthetic diet with low or high magnesium: mild (applicable to 95% of animals)

Housing in metabolic cages: mild (applicable to 8% of animals)

Blood sampling: mild (applicable to 100% of animals)

Micro-CT under general anaesthesia: mild (applicable to 54% of animals)

Cardiac ultrasonography under general anaesthesia: mild (applicable to 31% of animals)

Sacrifice under general anaesthesia: non-recovery (applicable to 100% of animals)

Overall maximum discomfort level: mild in 15% of animals, moderate in 85% of animals. (classifications for the individual experimental groups were shown in table 1 in paragraph 2A)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

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 to allow for the analysis of organs/tissues and isolation of cardiomyocytes.

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.

For most of the rats, a standard method from the European guideline will be used as listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU, except for the 8 rats (7% of animals) from which cardiac cells will be isolated. For isolation of vital cardiomyocytes using the Langendorff heart preparation, the heart is excised from the living animal after applying adequate anaesthesia. The diaphragm is opened via abdominal incision to expose the thoracic cavity, after which the thoracic cavity is opened by reflecting the thoracic cage upwards after bilateral incision of the thorax. The heart is excised by cutting the aorta, vena cava and pulmonary veins. This procedure will result in abrupt termination of circulation resulting in death.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0096
2. Titel van het project: The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment
3. Titel van de NTS: Kan extra magnesium de ontwikkeling van problemen aan hart- en vaten bij chronische nierziekte verminderen?
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: 17-01-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 21-02-2017, 04-04-2017, en 09-05-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 28-02-2017 tot 20-03-2017 en van 10-04-2017 tot 18-04-2017 en van 15-05-2017 tot 22-05-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 20-03-2017, 18-04-2017 en 22-04-2017
 - advies aan CCD: 16-06-2017
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 vragen: 28-02-2017
 - Datum antwoorden: 20-03-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Titel: Can additional magnesium reduce the development of cardiovascular complications in chronic kidney disease?

Project Proposal:

-3.1: De commissie mist een heldere uiteenzetting van de achtergronden van deze projectaanvraag. Er is kennelijk een omgekeerde relatie tussen Mg-gehalte in bloedplasma en het optreden van cardiovasculaire aandoeningen (door calcificaties of door een direct effect op de vaatspieren en het hart). Patiënten met slecht functionerende nieren hebben een hoger Mg-gehalte in het bloedplasma, maar desondanks toch een hoger risico op

cardiovasculaire aandoeningen. Onvoldoende onderbouwd blijft waarom de onderzoekers menen dat het verhogen van het (toch al hoge) Mg-gehalte in het bloedplasma middels Mg-suppletie zal leiden tot een vermindering van cardiovasculaire ziekte bij nierpatiënten. Heeft dit misschien te maken met het vergroten van de fractie vrije Mg-ionen ten opzichte van het totaal Mg-gehalte? In de achtergrond wordt niet uitgelegd uit welke componenten calcificaties bestaan en hoe zij ontstaan. Hierdoor is het ook onduidelijk hoe hypermagnesaemie calcificaties zou kunnen tegengaan. De commissie vermoedt dat Ca-ionen ook een belangrijke rol spelen, maar deze worden niet in samenhang met deze problematiek besproken. Aan het einde van de tweede alinea wordt vermeld dat een lage Mg-concentratie een risicofactor voor CKD is. CKD patiënten hebben toch juist een hoger Mg-gehalte in het bloedplasma? Bedoelden de onderzoekers hier CVD i.p.v. CKD?

Antwoord: Patiënten met slecht functionerende nieren hebben een verhoogd risico op cardiovasculaire ziekte. Bij deze mensen zijn veel risicofactoren aanwezig die het risico op cardiovasculaire ziekte verhogen. Dit zijn zowel de traditionele risicofactoren (net zoals in de algemene populatie) zoals hoge bloeddruk en hoog cholesterol, maar ook nierspecifieke risicofactoren zoals een hoge fosfaatconcentratie in het bloed en zoals u inderdaad terecht suggereert ook verhoogde calciumconcentratie in het bloed is een belangrijke risicofactor.

Bij dialysepatiënten (met dus eindstadium nierfalen) en ook bij mensen met vroegere stadia van nierziekte, is een associatie gevonden tussen een relatief hogere waarde (dus niet zozeer een waarde boven de referentiewaarde) van het magnesiumgehalte in het bloed en minder totale sterfte en minder sterfte aan hart- en vaatziekten. De optimale waarde voor de magnesiumconcentratie bij dialysepatiënten blijkt duidelijk hoger dan de in de algemene bevolking gemiddelde waarde en ook hoger dan de meest voorkomende waarde bij dialysepatiënten. Bovendien kan niet gesteld worden dat alle mensen met een verminderde nierfunctie (maar nog niet van dialyse afhankelijk) een verhoogde magnesiumwaarde in het bloed hebben. Bij minder ernstige stadia van nierinsufficiëntie kan het magnesiumgehalte binnen de waarden blijven die voor de algemene bevolking gelden als normaal. Aangezien het optimum voor mensen met een nierziekte dus hoger lijkt te liggen dan als normaal wordt beschouwd is er voor patiënten met een nierziekte een window-of-opportunity. Deze hogere optimale waarde is op meerdere manieren te verklaren en is de kern van onze hypothese. Het is mogelijk dat de optimale waarde voor iemand met een verminderde nierfunctie anders is dan voor gezonde personen, bijvoorbeeld door een veranderde binding aan andere moleculen in het bloed, veranderde balans tussen de verdeling van magnesium over de verschillende lichaamscompartimenten en veranderde hoeveelheden van andere elektrolyten (zoals calcium en fosfaat) die bijdragen aan ectopische calcificatie. In die situatie zou dus een hoger magnesium meer protectie kunnen bieden.

De wijze waarop een hoger magnesium cardiovasculaire ziekte tegen kan gaan is nog niet opgehelderd. Kijkend naar de biologische functies van magnesium, met een rol voor veel enzymreacties en beïnvloeding van passage van andere elektrolyten over de celmembranen, zijn veel beschermende mechanismen mogelijk, die verstoord zijn bij nierfalen. Specifiek voor vasculaire calcificatie zijn er meerdere mechanismen gesuggereerd. Vasculaire calcificatie bestaat uit componenten die vergelijkbaar zijn met bot en inderdaad is calcium daarbij ook een belangrijke component. Bij het proces van vasculaire calcificatie wordt er een extracellulaire matrix gevormd van eiwitten die ook in bot voorkomen, zoals een netwerk van collageen en osteonectin, waarin hydroxyapatiet (een mineraal van calcium en fosfaat, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) zich afzet, leidend tot een gecalcificeerde matrix. De botachtige matrixeiwitten worden uitgescheiden door gladde spiercellen uit de vaatwand die zijn gedifferentieerd tot een meer bot-achtig fenotype doordat zij bot-achtige genen tot expressie brengen. De veranderde genexpressie van deze gladde spiercellen kan ontstaan in respons op

een overmaat aan calcificatie stimulerende factoren waarbij een hoog fosfaatgehalte een belangrijke stimulans is. Het neerslaan van hydroxyapatiet in de extracellulaire matrix wordt bevorderd door matrix vesicles die worden uitgescheiden door de bot-achtige gladde spiercellen en rijk zijn aan calcium en fosfaat en enzymen bevatten. Bij een overmaat aan calcium, fosfaat en een tekort aan calcificatie remmende eiwitten (zoals MGP), vormen deze matrix vesicles een nidus voor de vorming van hydroxyapatiet kristallen, die vervolgens zich kunnen afzetten in de extracellulaire matrix.(1)

Het mechanisme waarop een hoger magnesiumgehalte dit proces remt is niet opgehelderd. Er zijn verschillende mechanismen gesuggereerd. Mogelijke mechanismen zijn een direct remmend effect van extracellulaire magnesiumionen op de vorming van hydroxyapatiet kristallen, remmen van calciumkanalen waardoor de overmatige calciuminflux in de gladde spiercellen afneemt, een effect via binding aan de calcium-sensing receptor gevolgd door een onbekend moleculair mechanisme waardoor calcificatie wordt geremd, of een effect van magnesium door intracellulair het calcificatieproces te remmen bijvoorbeeld door remming van de expressie van bot-achtige genen (via een nog onbekend moleculair mechanisme).(2)

Op basis van deze genoemde argumenten is onze hypothese dat een hoger magnesium in het dieet het optreden van cardiovasculaire aandoeningen kan verminderen. We hopen hiermee de achtergrond van de aanvraag voldoende te hebben verduidelijkt. In reactie op uw laatste vraag kunnen we inderdaad zeggen dat waar "risicofactor voor CKD" stond "risicofactor voor cardiovasculaire ziekte in CKD" werd bedoeld. We hebben dit aangepast.

1. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. Circulation research. 2011;109(6):697-711.

2. Massy ZA, Nistor I, Apetrii M, Brandenburg VM, Bover J, Evenepoel P, et al. Magnesium-based interventions for normal kidney function and chronic kidney disease. Magnes Res. 2016.

-3.1: Hebben de dieren in het beoogde (chirurgische) model met verminderde nierfunctie ook een verhoogd Mg-gehalte in het bloed? Wat gebeurt er met het Mg-gehalte in het bloed wanneer er een hoog of laag Mg-dieet wordt gegeven aan dieren met een slechte nierfunctie?

Antwoord: Het is bekend dat er bij eindstadium nierfalen een verhoging van de serum magnesiumspiegel kan optreden ten gevolge van een verminderde renale magnesiumexcretie. Daartegenover echter staat dat kaliumbeperkende dieetadviezen doorgaans ook leiden tot minder magnesium inname met het dieet, daar beide mineralen veel in de dezelfde dieetproducten voorkomen. De nierinsufficiëntie die in de experimenten na een succesvolle nefrectomieprocedure bij de ratten geïnduceerd wordt, is geen eindstadium van nierfalen. Uit ervaring in het VUMC met nefrectomie bij ratten weten we dat er bij deze dieren geen biologische neveneffecten van de verminderde nierfunctie werden gezien. Derhalve verwachten we niet dat de dieren in het chirurgisch model een verhoogde serum magnesium waarde zullen hebben.

In de pilot waarin de magnesium diëten worden getest, zal een hoog en een laag magnesium dieet worden geselecteerd dat verdragen wordt (geen ernstige hypo- of hypermagnesiëmie veroorzaakt) en waarbij het dieet met hoog magnesium een hoger serum magnesium tot gevolg heeft. Aangezien we in de pilot een "laag" magnesium dieet gebruiken dat de hoeveelheid magnesium bevat die voldoet aan de aanbevolen hoeveelheid volgens de Amerikaanse richtlijn voor rattenvoeding, verwachten we met dit dieet een normaal of in ieder geval niet ernstig verlaagd serum magnesium te zien. Bij de dieren met nefrectomie verwachten we een vergelijkbaar effect te zien, namelijk een normaal of in ieder geval niet ernstig verlaagd serum magnesium bij het "laag" magnesium dieet en een hogere serum magnesiumspiegel zonder ernstige hypermagnesiëmie bij het hoog magnesium dieet. Als er meer magnesium aanbod is, zoals bij het hoog magnesium dieet, kan de renale excretie

stijgen om dit hogere aanbod deels te compenseren. Theoretisch zou het kunnen dat de renale excretie van magnesium meer stijgt bij de dieren zonder nefrectomie dan bij de dieren met nefrectomie. Hierdoor zouden de dieren met nefrectomie dan een iets hoger serum magnesium kunnen krijgen bij het hoog magnesium dieet, dan de dieren zonder nefrectomie. Echter, we verwachten we dat dit verschil tussen dieren met en zonder nefrectomie gering zal zijn en het dieet dus ook bij de dieren met nefrectomie geen ernstige hypermagnesiëmie zal veroorzaken.

-3.1: Wanneer er heel weinig magnesium beschikbaar is, dan zal de Mg-huishouding in de darm veranderen om zoveel mogelijk magnesium in het lichaam te krijgen/houden. Een beschrijving van dit mechanisme en eventuele implicaties voor de experimenten ontbreken. Antwoord: De relatieve opname van magnesium in de darm zal inderdaad worden aangepast aan het aanbod. Bij minder aanbod is er relatief meer opname, bij veel aanbod is er relatief minder opname en er is ook een limiet aan de totale opnamecapaciteit. Hierdoor is de hoogte van het dieet niet 1 op 1 te vertalen naar de magnesiumopname in de darm. Echter, er is een ook een limiet aan de mogelijkheid tot aanpassing van de relatieve opname waardoor er wel degelijk een associatie is tussen magnesium inname via het dieet en de concentratie in het bloed. Uit eerdere studies is bekend dat het mogelijk is om met variatie van het magnesiumaanbod in het dieet een variatie van de magnesiumconcentratie in het bloed te bereiken bij ratten. Het doel van de experimenten is niet om de relatie tussen de exacte hoeveelheid opgenomen magnesium en het optreden van cardiovasculaire complicaties te kwantificeren, maar om vast te stellen of we door het ophogen van magnesium in het dieet het optreden van cardiovasculaire complicaties kunnen verminderen. Een verschil in relatieve opname bij een hoog of laag magnesium dieet staat het beantwoorden van de vraag dus niet in de weg mits het verschil in relatieve opname niet leidt tot een netto identieke absorptie van magnesium bij de verschillende diëten. Dit laatste zal worden ondervangen met de pilotstudie waarin het effect van verschillen in magnesium-content van het diëet op de plasma magnesium spiegel zal worden geëvalueerd.

-3.4.2: Kan het effect van Mg²⁺ op calcificaties in bloedvaten en op hartcellen niet in dezelfde dieren onderzocht worden? Wellicht kunnen de experimenten op één locatie plaatsvinden: hierdoor wordt de helft van het aantal dieren uitgespaard. Doelstellingen 4 en 5 kunnen in principe met dezelfde dieren behaald worden als doelstellingen 1,2, en 3. Antwoord: Alvorens tot het besluit te komen om de experimenten op 2 locaties uit te willen voeren, hebben we de mogelijkheden op de 2 locaties uitgebreid geëxploreerd. Hieruit hebben we geconcludeerd dat het alleen mogelijk is om de beschreven experimenten uit te voeren door de lokale faciliteiten en beschikbare expertise en infrastructuur van Radboudumc en VUMC te combineren.

Voor het vervaardigen van micro-CT is de apparatuur en expertise aanwezig in Nijmegen. Deze apparatuur is locatie gebonden en niet transporteerbaar naar het VUMC, waar deze apparatuur niet aanwezig is. Het is dus alleen mogelijk om het tijdsbeloop van calcificatie te beoordelen met micro-CT als we deze experimenten in Nijmegen uitvoeren. Voor het isoleren van primaire cardiomyocyten uit het rattenhart zijn apparatuur, logistiek en expertise in het VUMC aanwezig. Deze procedure vereist niet alleen specifieke apparatuur, maar ook een grote deskundigheid van het personeel, welke met een aanzienlijke leercurve gepaard gaat. Opbouwen van deze expertise zou ook van invloed zijn op het aantal proefdieren. In het VUMC wordt deze procedure zeer geregeld uitgevoerd waardoor uitgebreide ervaring aanwezig is en de procedure geroutineerd uitgevoerd kan worden. In Nijmegen beschikken we niet over de apparatuur en expertise voor het uitvoeren van deze procedure. Gezien de benodigde apparatuur en leercurve die met de procedure gepaard gaat, is het niet redelijkerwijs haalbaar om deze procedure in Nijmegen te implementeren.

Daarnaast moet voor het isoleren van vitale cardiomyocyten snel gehandeld worden gebruik makend van de Langendorff set-up en wordt bij excisie van het hart een stukje van de aorta meegenomen, waardoor het moeilijk is om volledig vaatmateriaal van de aorta ascendens vanuit hetzelfde dier te krijgen. Verder is in het VUMC bij de afdeling waarmee wordt samengewerkt eveneens uitgebreide ervaring met echocardiografie bij ratten, wat dus op deze locatie in hetzelfde experiment kan worden gecombineerd.

-3.4.2: Direct na de nefrectomie krijgen de dieren een dieet met hoog fosfaat en veel of weinig Magnesium (beschreven in DAP1). In doelstelling 2 (onderdeel 3.2) staat het effect van Magnesium op gevestigde calcificaties centraal. Hoe kan dit onderzocht worden met een experiment waarin het hoge Mg-dieet tegelijk met het hoog fosfaat dieet gestart wordt? Op dat moment zijn er immers nog geen calcificaties.

Antwoord: In het experiment willen we zowel onderzoeken of een hoog magnesium dieet het ontstaan van vasculaire calcificatie kan tegengaan (preventie; doelstelling 1 uit onderdeel 3.2 van de projectaanvraag), als onderzoeken of een hoog magnesium dieet wanneer er eenmaal vasculaire calcificatie is opgetreden de verdere ontwikkeling hiervan kan vertragen (effect op gevestigde calcificatie; doelstelling 2 uit onderdeel 3.2). Met het starten van het hoog magnesium dieet gelijktijdig met het hoog fosfaat dieet, zorgen we er inderdaad voor dat we het hoog magnesium dieet starten op een moment waarop er nog geen vasculaire calcificaties zijn. Met deze opzet kunnen we doelstelling 1 onderzoeken door aan het eind van het experiment in vaatweefsel te bekijken of er minder dieren vasculaire calcificatie hebben in de groep met een hoog magnesium dieet, en ook kunnen we kijken of de mate van calcificatie in de groepen verschilt. Door gebruik te maken van microCT op verschillende tijdstippen, kunnen we in hetzelfde experiment ook doelstelling 2 onderzoeken. Hiervoor zullen we kijken of vanaf het moment dat we de vasculaire calcificatie voor het eerst zien op de microCT, de progressie van de calcificatie trager verloopt in de groep met het hoog magnesium dieet. Het is namelijk onaanneemelijk dat een directe start met additioneel magnesium calcificatie volledig zal kunnen voorkomen.

Verder hebben we nog toegevoegd dat bij enkele dieren in het experiment gebruik gemaakt zal worden van metabole kooien om naast de serum fosfaatpiegels ook fosfaatexcretie te kunnen meten, zodat we kunnen nagaan of het effect van het hoog fosfaat dieet op de fosfaathuishouding gelijk is in de groep met hoog en laag magnesium dieet. Mocht er verschil zijn tussen beide groepen, dan kunnen we de effecten van fosfaathuishouding en magnesiumdieet bij de data-analyse onderscheiden.

-3.4.2: Wanneer tegen de verwachting in weinig calcificaties ontstaan, dan kan het model aangepast worden door calcitriol toe te voegen. Wat is de rationale achter het toevoegen van calcitriol om calcificaties te induceren? Er zijn immers meerdere opties om calcificatie te stimuleren, maar de keuze voor calcitriol is niet toegelicht c.q. onderbouwd. De DEC adviseert om een go/no go moment op te nemen na de pilots met criteria (o.a. betreffende calcificaties) op basis waarvan besloten zal worden het project te continueren.

Antwoord: Calcitriol, de actieve vorm van vitamine D, heeft onder meer als effect dat de opname van calcium in de darm verhoogd wordt en de renale excretie verminderd wordt, waardoor de plasma calcium spiegel stijgt en ook heeft calcitriol een stimulerend effect op de absorptie van fosfaat in de darm. Calcium is een van de hoofdbestanddelen van vasculaire calcificatie en een verhoogde calciumspiegel bevordert het ontstaan van calcificaties. Toevoeging van calcitriol aan het model van nefrectomie met hoog fosfaatdieet in ratten leidt tot eerder ontstaan van ernstigere calcificaties en is een veelvuldig beschreven model voor vasculaire calcificatie.(3, 4) Actief vitamine D zou dus een goede toevoeging zijn indien onverwacht onvoldoende calcificatie optreedt in het model van alleen nefrectomie en hoog

fosfaat dieet. De reden dat we aanvankelijk geen vitamine D toevoegen, is omdat we alleen noodzakelijke interventies willen doen en geen ernstigere calcificatie willen induceren dan noodzakelijk is voor het bestuderen van de wetenschappelijke vraagstelling, enerzijds om de dieren niet onnodig te belasten en anderzijds omdat bij een te sterke inductie van calcificatie het lastiger zal zijn om een effect van de interventie (magnesium) te kunnen vaststellen. Na de pilot voor het nefrectomie model zal er een go/no go moment zijn, waarbij wat betreft vasculaire calcificatie het criterium voor doorgaan naar het volgende onderdeel van het project zal zijn dat er na succesvolle nefrectomie procedure bij ten minste 60% van de dieren vasculaire calcificatie (gedefinieerd als een positieve Von Kossa-kleuring) optreedt. We hebben het go/no go moment en de volledige criteria daarbij nu toegevoegd in paragraaf 3.4.2 en de criteria ook gespecificeerd in de figuren 1 en 2.

3.Henley C, Colloton M, Cattley RC, Shatzen E, Towler DA, Lacey D, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(7):1370-7.

4.Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, et al. The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* 2008;73(3):300-7.

-3.4.2:Waarom wordt de eerste pilot bij normale ratten gedaan i.p.v. bij ratten met verminderde nierfunctie?

Antwoord: In de eerste pilot willen we nagaan of we door een verandering van de hoeveelheid magnesium in het dieet een verandering van opname van magnesium in de darm kunnen bewerkstelligen, zich uitend in een verandering van de serum magnesiumspiegel en of dit dieet wordt verdragen.

Het is bekend dat bij eindstadium nierfalen de serum magnesiumspiegels kunnen stijgen ten gevolge van een verminderde renale excretie zelf, waardoor het lastiger is aan te tonen dat een variatie door het dieet alleen komt. Bij minder ernstige stadia van nierinsufficiëntie is dit niet het geval. De mate van nierinsufficiëntie die we bij de dieren zullen induceren middels nefrectomie is minder ernstig dan eindstadium nierfalen. We verwachten daarom geen effect van de nefrectomie op serum magnesiumspiegels. Dit komt overeen met de ervaring vanuit eerdere nefrectomie experimenten in het VUMC, waarbij na succesvolle nefrectomie geen biologische neveneffecten op mineralen van verminderde nierfunctie werden gezien. Als er desondanks toch een gering effect van de verminderde nierfunctie op de plasma magnesiumspiegels zou zijn dan verwachten we niet dat dit verschil dusdanig is dat dit het verdragen van het magnesium dieet zal belemmeren.

-3.4.2: Uit de tijdlijn wordt niet duidelijk waarom de onderzoekers een vergunning tot april 2020 vragen.

Antwoord: Er is een ruime looptijd aangehouden om reserve-tijd in te bouwen voor het geval er vertraging optreedt in de uitvoer van de experimenten. De genoemde looptijd is waarschijnlijk ruimer dan op dit moment noodzakelijk kan worden geacht. We zullen de einddatum van de vergunning daarom aanpassen naar medio 2019. Hierbij houden we er ook rekening mee dat de startdatum van het project na verkregen goedkeuring later te verwachten is dan het aanvankelijk gewenste tijdstip in april dit jaar (nu aangepast naar juni dit jaar). In de tijdlijn hadden we de minimale tijdsduur van de onderdelen afgebeeld, daarbij nog geen rekening houdend met eventuele herhaling van de proef in pilot 1 en pilot 2, en met dat uit pilot 2 een langere follow-up duur voor onderdeel A en B zal kunnen volgen (max 16 i.p.v. 12 weken) en dat in onderdeel A en B niet alle dieren op hetzelfde tijdstip zullen starten omdat het niet mogelijk is alle operaties, scans en cardiomyocyt isolaties op dezelfde dag uit

te voeren. De minimale tijdsduur van de onderdelen is nu weergegeven in geel en de maximale duur per onderdeel in grijs.

Description of Animal Procedures:

-B: Waarom willen de aanvragers alleen mannelijke ratten gebruiken? Een wetenschappelijke onderbouwing voor deze keuze ontbreekt.

Antwoord: Het diermodel dat we in de studie gebruiken, nefrectomie in combinatie met een hoog fosfaat dieet, is in de literatuur vrijwel altijd beschreven bij mannelijke ratten. Het model is in dit geslacht dus het best gevalideerd. Voor een goede reproduceerbaarheid zullen wij in deze studie ook mannelijke ratten gebruiken.

-H: Hoe lang duren de imaging procedures en welke anesthesie wordt hiervoor toegepast? De dieren met verminderde nierfunctie zijn extra kwetsbaar.

Antwoord: De verwachte duur van de microCT is 20-50 minuten en voor echografie van het hart 20-30 minuten. Een aantrekkelijke vorm van anaesthesie die toegepast kan worden is gasanaesthesie met isofluraan. Pijnstilling is bij deze non-invasieve imaging procedures niet nodig en dus is gasanaesthesie, met weinig tot geen pijnstillende eigenschappen, zonder toevoeging van andere middelen te gebruiken. Voordeel van deze vorm van anaesthesie zijn de eenvoudige toedieningswijze en de farmacokinetische eigenschappen met snelle absorptie bij inademing, snelle verdeling via de bloedstroom, en snelle uitscheiding (vrijwel volledig ongemetaboliseerd) via de longen. Hierdoor is de diepte van anaesthesie goed titreerbaar met snelle inductie en snel herstel en kan deze vorm van anaesthesie herhaaldelijk toegepast worden. Tevens zorgen deze farmacokinetische eigenschappen ervoor dat het middel veilig toegediend kan worden bij een verminderde nierfunctie. In het VUMC wordt dit middel zonder problemen toegepast bij ratten met nefrectomie. Bij echografie van het hart in ratten door de afdeling fysiologie van het VUMC is dit ook de standaardvorm van anaesthesie die toegepast wordt.

-J: De scores voor activiteit, aanblik, en herstel na operatie zijn omschreven. Onduidelijk is waar deze scores toe leiden. Bij welke maximale score worden de dieren uit de proef genomen?

Antwoord: De parameter lichaamsgewicht is een absolute indicatie voor het bereiken van een humaan eindpunt indien er meer dan 20% gewichtsverlies is. De andere genoemde parameters en scores worden gebruikt als hulpmiddel om het welzijn te monitoren, indicatie te stellen voor het oplossen van problemen die een negatief effect op het welzijn hebben, en om een besluit te nemen over implementatie van een humaan eindpunt indien er een persistente substantiële afname van het welzijn van de dieren is. Hierbij wordt, uitgezonderd bij het lichaamsgewicht, geen absolute score gehanteerd, maar gekeken naar het totaalbeeld in de individuele situatie. In geval van twijfel zal aan de functionaris voor het dierenwelzijn advies worden gevraagd omtrent de te nemen vervolgacties.

-K: De nefrectomie operatie geeft matig ongerief. Resulteert de 5/6 nefrectomie in ernstig ongerief voor alle dieren? Dit lijkt niet in overeenstemming met de beschrijving van het ongerief onder I: "The nephrectomy surgery will result in reduced renal function. If only a small volume of kidney tissue remains after the operation, this can result in full-blown kidney failure with associated effects on serum composition, hemoglobin levels and mineral and bone metabolism, which could have adverse effects on welfare. In previous studies in the UMC, we did not experience side effects of decreased renal function. Apparently, the remaining kidney function is sufficient for animals to survive without compromising their welfare." Welk percentage van de dieren krijgt 'full-blown kidney failure' na nefrectomie? Leidt 'full-blown kidney failure' tot een humaan eindpunt, en welke criteria worden daarvoor

gehanteerd (bijvoorbeeld plotse gewichtstoename)? De commissie verzoekt de aanvragers het ongerief voor de dieren preciezer op te schrijven en in overeenstemming te brengen met de tekst onder I.

Antwoord: De nefrectomie resulteert nadrukkelijk niet voor alle dieren in ernstig ongerief. De beschrijving van het ongerief zoals u kunt vinden onder I is gebaseerd op de ervaring met nefrectomie bij ratten in het VUMC. De nefrectomie wordt daar geclassificeerd als maximaal matig ongerief (ook in projectaanvragen volgens de meest actuele procedure). Aangezien in de handleiding van het projectaanvraagformulier in de toelichting op de classificatie blijvende orgaanschade wordt genoemd onder ernstig ongerief, twijfelden we of we de nefrectomie toch onder maximaal ernstig ongerief moesten classificeren ondanks dat van de verminderde nierfunctie geen nadelige effecten op het welbevinden van de dieren werden waargenomen in eerdere experimenten. We hebben daarom overleg gehad met de animal welfare officer (Bea Zoer) en zij adviseerde om het ongerief beter te hoog in te schatten en dus te classificeren als ernstig. Deze classificatie komt echter niet overeen met het geobserveerde welbevinden bij de experimenten in het VUMC en dit verklaart dus ook de discrepantie met onze beschrijving van ongerief onder I. We hebben de classificatie van het ongerief nu gecorrigeerd naar maximaal matig en horen graag of u hiermee akkoord gaat.

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: De NTS is waar nodig aangepast.

-De titel van de NTS dekt de lading beter dan de titel van het projectvoorstel.

Antwoord: Naar aanleiding van uw opmerking hebben we de titel van het projectvoorstel beter in overeenstemming gebracht met de titel van de NTS door deze te wijzigen in: Can additional magnesium reduce the development of cardiovascular complications in chronic kidney disease?

-3.4: De één na laatste zin is niet begrijpelijk voor de doelgroep. De commissie adviseert u het laatste deel (na 'in een pilot getest') weg te laten.

Antwoord: Het laatste deel van deze zin is conform uw advies verwijderd.

- Datum vragen: 10-04-2017
- Datum antwoorden: 18-04-2017

Project Proposal:

-3.1 Vraag 1: De achtergronden van het project zijn nu uitgebreider toegelicht, maar de commissie kan nog steeds niet goed navolgen op grond van welke hypothese de onderzoekers verwachten dat extra magnesium de cardiovasculaire complicaties in CKD kan verminderen. Zonder een heldere hypothese kan de commissie niet beoordelen of de experimenten met het beschreven diermodel kunnen leiden tot het bereiken van de uiteindelijke doelstelling van het project (vermindering van het risico op cardiovasculaire complicaties bij patiënten met CKD). Kunnen de onderzoekers een heldere hypothese toevoegen?

Antwoord: De hypothese van dit project is dat een verhoging van de magnesium intake via het dieet bij chronische nierinsufficiëntie leidt tot minder ontstaan van vasculaire calcificatie gedefinieerd als een lagere calciumcontent in de vaten, en tot minder ontstaan van hypertrofie van het hart gedefinieerd als de ratio van hartgewicht en lichaamsgewicht. We hebben deze hypothese nu expliciet vermeld in paragraaf 3.1 van de project proposal.

Deze primaire hypothese baseren we op de achtergrond zoals aan u werd toegelicht. Primair doel van dit project is niet om het moleculaire mechanisme achter deze relatie vast te stellen. Het primaire doel van dit project is daarom ook niet om een hypothese met betrekking tot een achterliggend moleculair mechanisme te bevestigen.

-3.1 Vraag 2: Het diermodel is geen model voor nierfalen en vertoont geen verhoogde serum magnesium waarden. De link tussen het diermodel en de klinische situatie is niet duidelijk aangegeven. Kunnen de onderzoekers dit kort en bondig toelichten? Uit het antwoord op 3.4.2 vraag 4 blijkt eveneens dat het chirurgische model niet goed overeenkomt met de klinische situatie. Een aspect dat de commissie daarbij nog ter overweging wil geven is het feit dat de ingreep (resectie nier) mogelijk een ernstige verstoring zal geven van de calcitriolproductie (worden er analyses van calcitriol overwogen?), een situatie die een sterke deviatie van de patiëntcondities met zich meebrengt.

Antwoord: Mogelijk heeft onze opmerking dat het model met nefrectomie geen model is voor eindstadium nierfalen bij u voor verwarring gezorgd. Het diermodel is GEEN model voor eindstadium nierfalen, maar het is zeker WEL een model voor nierfalen. Nierfalen wordt gekenmerkt door een vermindering van nierfunctie welke weerspiegeld wordt in een stijging van kreatinine en ureum concentraties in het bloed. Nierfalen kent verschillende stadia, namelijk I tot en met V. Stadium V is eindstadium nierfalen, wat wil zeggen dat nierfunctie vervangende therapie nodig is om de functie van de nier over te nemen en te kunnen overleven. De stadia I tot en met IV zijn stadia met oplopende ernst van nierfalen, waarbij het nog mogelijk is te overleven zonder nierfunctie vervangende behandeling. Verstoringen van elektrolytconcentraties in het bloed treden niet op bij minder ernstige stadia van nierfalen en wel bij ernstigere stadia van nierfalen. Het diermodel is een model waarbij nierfalen wordt geïnduceerd in een dusdanig stadium dat geen elektrolytverstoringen worden gezien. In combinatie met een hoog fosfaat dieet treden in dit model vaatcalcificaties op. Bij dit diermodel is er dus net als bij mensen met een dergelijk stadium van nierfalen een verminderde nierfunctie gekenmerkt door een verhoogd kreatinine en ureumgehalte in het bloed en een verhoogd risico op het optreden van vaatcalcificaties.

Klinische observationele studies, hebben zowel in patiënten met eindstadium nierfalen als in patiënten met niet-eindstadium nierfalen, een associatie laten zien tussen de hoogte van het magnesiumgehalte in het bloed en overall-mortaliteit en mortaliteit door hart- en vaatziekten.(1-3) Het diermodel met nierfalen heeft dus een goede link naar de klinische situatie bij mensen met (niet-eindstadium) nierfalen.

In reactie op uw vraag ten aanzien van calcitriol, kunnen we melden dat uit eerder onderzoek is gebleken dat bij ratten met door nefrectomie geïnduceerd matig nierfalen geen daling van calcitriol optreedt.(4)

1. de Roij van Zuidewijn CL, Grooteman MP, Bots ML, Blankestijn PJ, Steppan S, Buchel J, et al. Serum Magnesium and Sudden Death in European Hemodialysis Patients. PLoS One. 2015;10(11):e0143104.
2. Kanbay M, Yilmaz MI, Apetrii M, Saglam M, Yaman H, Unal HU, et al. Relationship between serum magnesium levels and cardiovascular events in chronic kidney disease patients. Am J Nephrol. 2012;36(3):228-37.
3. Van Laecke S, Nagler EV, Verbeke F, Van Biesen W, Vanholder R. Hypomagnesemia and the risk of death and GFR decline in chronic kidney disease. The American journal of medicine. 2013;126(9):825-31.
4. Takemoto F, Shinki T, Yokoyama K, Inokami T, Hara S, Yamada A, et al. Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats. Kidney Int. 2003;64(2):414-20.

-3.4.2 Vraag 1: De commissie is van mening dat sommige apparatuur wèl verplaatst zou kunnen worden en dat onderzoekers met specifieke expertise ook op een andere locatie

zouden kunnen werken. Zij vindt dit geen goede argumenten tegen het samenvoegen van de experimentele groepen en het uitvoeren van de experimenten op één locatie. Samenvoeging resulteert namelijk in een substantiële afname van het aantal benodigde dieren. Een ander argument betreft het beschikbare weefsel. Komt men weefsel tekort wanneer de calcificatiestudie en hartstudie in dezelfde dieren worden uitgevoerd?

Antwoord: We begrijpen het belang van het uitvoeren van de experimenten op een dussdanige wijze dat het aantal benodigde dieren zo beperkt als mogelijk is. Naar aanleiding van uw opmerking hebben we daarom nog een keer met veel aandacht de mogelijkheden bekeken.

Voor experiment deel A (vaatcalcificatie) gebruiken we micro-CT. Het apparaat dat hiervoor nodig is, is alleen aanwezig op de locatie in Nijmegen. Dit is een groot apparaat en verplaatsen van dit apparaat naar Amsterdam is uitgesloten.

Voor experiment deel B (hart) gebruiken we echografie van het hart. Bij deze echografie hebben we naast meer gebruikelijke maten als wanddikte en knijpfunctie van de linkerhartkamer, ook specifieke maten van diastolische hartfunctie nodig, te weten deviatie van het atriale septum, PAP-drukken en E/A ratio. Dit omdat er bij nierfalen met name diastolische dysfunctie van het hart optreedt. De deskundigheid voor het vervaardigen van deze geavanceerde echografie van het hart is aanwezig in Amsterdam. Echografie is een realtimeonderzoek, waarbij de betrouwbaarheid van de resultaten sterk afhankelijk is van de kwaliteit van de uitvoerder van de procedure. Mindere kwaliteit van deze uitvoering is na de procedure niet meer op te lossen bij de interpretatie van de beelden. Voorbeeld is dat wanneer een meting verricht wordt in een net iets ander vlak, dit heel andere resultaten kan geven. Indien de echografie dus niet uitgevoerd wordt door de specifiek voor deze metingen ervaren en deskundige mensen (aanwezig in Amsterdam) kan dit grote gevolgen hebben voor de betrouwbaarheid van de resultaten. Aangezien er zo'n 3 nefrectomie procedures per dag kunnen worden gedaan, zullen de tijdstippen voor echografie bij de dieren op verschillende momenten vallen. Tijdens de follow-up periode zal op meerdere tijdstippen een echografie worden verricht. Indien dus het personeel uit Amsterdam dit in Nijmegen zouden moeten doen, zou dit betekenen dat zij voor heel veel korte dagdelen naar Nijmegen zouden moeten komen, met steeds aanzienlijke reistijd waarop zij in Amsterdam hun werkzaamheden niet kunnen verrichten. Dit is qua bedrijfsvoering helaas niet realiseerbaar.

Voor onderdeel B (hart) moeten we ook gebruikmaken van een Langendorff opstelling voor isolatie van vitale hartspiercellen. Deze opstelling bestaat uit een samenstelling van meerdere onderdelen die moet worden opgebouwd. Hiermee kan bereikt worden dat het hart vlot en onder de optimale condities van oxygenatie en temperatuur kan worden behandeld met enzymen, zodat levende cardiomyocyten geïsoleerd kunnen worden. Deze apparatuur is aanwezig in Amsterdam. Verplaatsen van de apparatuur is fysiek moeilijk maar qua bedrijfsvoering onmogelijk. Zoals toegelicht voor de echoprocedure, zullen de dieren het eindpunt op verschillende momenten bereiken en zal dus de cardiomyocyt isolatie apparatuur op afzonderlijke momenten verspreid over een langere periode nodig zijn. Het is niet mogelijk deze apparatuur gedurende deze periode naar Nijmegen te verplaatsen omdat deze ook volop in gebruik is voor andere experimenten in Amsterdam. Bovendien is het essentieel dat de Langendorff opstelling gepositioneerd is direct naast de plaats waar de excisie van het hart plaatsvindt en ook nabij faciliteiten voor microscopie en celkweek, zodat de cellen vitaal kunnen blijven. In Amsterdam is de locatie van de faciliteiten hierop afgestemd, terwijl dit in Nijmegen lastiger te realiseren is. Verder is deskundig, getraind en ervaren personeel nodig om de procedure van cardiomyocyt isolatie uit te voeren. De procedure vereist niet alleen handvaardigheid en kennis, maar ook door ervaring ontstaan vermogen om inschattingen te maken die niet in een protocol gevangen kunnen worden, zoals het voelen aan het hart om

aan de consistentie te bepalen wanneer het juiste tijdstip is bereikt en de enzymen voldoende hebben gewerkt. De procedure wordt in Amsterdam uitgevoerd door een team van op elkaar ingespeeld personeel, waardoor deskundigheid wordt gecombineerd en efficiënt wordt gewerkt waardoor isolatie van vitale cellen mogelijk is. Ook als personeel uit Nijmegen getraind zou worden, zal de procedure vaker mislukken omdat deze procedure voor deze mensen niet een routine wekelijkse taak is (in tegenstelling tot voor het personeel in Amsterdam) en dit zou een toename van het benodigde aantal dieren voor deze procedure veroorzaken. Personeel van Amsterdam in Nijmegen laten werken, is om dezelfde redenen als beschreven voor de echografie qua bedrijfsvoering niet mogelijk. Daarnaast is in Amsterdam de apparatuur aanwezig om in de in vitro experimenten met calciumfluxen en de achtereenvolgende spiercontracties in respons op elektrische stimulatie in individuele vitale cardiomyocyten te meten. Deze apparatuur omvat een microscoop, software en hulpmiddelen voor de elektrische prikkeling (deels custom made). Deze apparatuur is heel lastig verplaatsbaar en kan eveneens niet gemist worden in Amsterdam vanwege andere experimenten.

Ondanks dat we de mogelijkheden nogmaals zorgvuldig hebben bekeken, hebben we om genoemde redenen helaas moeten concluderen dat het onmogelijk is om de experimentele groepen samen te voegen en de experimenten op één locatie uit te voeren.

-3.4.2 Vraag 2: Het gegeven antwoord is geen antwoord op de vraag. De onderzoekers worden verzocht deze vraag opnieuw te beantwoorden.

Antwoord: Naar aanleiding van uw opmerking hebben we geconstateerd dat de formulering van de doelen van het project onvoldoende duidelijk was en we de formulering hiervoor ongelukkig hadden gekozen. Het doel van het project is NIET om te onderzoeken wat het effect is op bestaande vaatcalcificatie als een hoog magnesium dieet wordt gestart als deze vaatcalcificatie al aanwezig is. Enerzijds willen we onderzoeken of er minder vaatcalcificatie ontstaat als er een hoog magnesiumdieet wordt gegeven (doelstelling 1). Anderzijds willen we onderzoeken of een hoog magnesiumdieet een vertraging kan opleveren in moment van ontstaan en daaropvolgende progressie van vaatcalcificatie (doelstelling 2). We hebben de tekst van de doelstellingen aangepast om dit beter te verwoorden.

Description of Animal Procedures:

-B: De commissie is van mening dat de gegeven onderbouwing ('het model is in dit geslacht het best gevalideerd') onvoldoende grond is om het onderzoek alleen met mannelijke dieren uit te voeren. De onderzoekers worden verzocht een betere onderbouwing te geven of dieren van beide geslachten te gebruiken.

Antwoord: We hebben uw advies overgenomen om dieren van beide geslachten in evenwichtige verhouding te gebruiken. We hebben dit in de tekst van de DAP aangepast.

-J: De beschrijving van het humane eindpunt is niet duidelijk genoeg. De commissie heeft nog steeds geen eenduidig beeld van het te hanteren humane eindpunt.

Antwoord: Voor het vaststellen van het humane eindpunt wordt steeds gebruik gemaakt van specifieke scores die eenduidig gehanteerd worden. We hebben dit in de tekst nu duidelijker aangegeven.

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: De NTS is ongewijzigd.*

- Datum vragen: 15-05-2017
- Datum antwoorden: 22-05-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-3.1: De onderzoekers hebben op verzoek van de commissie een hypothese geformuleerd. Daarbij vermelden zij dat deze hypothese is gebaseerd op de beschreven achtergrond, en dat het vaststellen van het moleculaire mechanisme achter deze relatie niet het doel is van dit project.

De toegevoegde hypothese zorgt niet voor meer begrip van de achtergrond waarop deze hypothese is gebaseerd. De commissie blijft van mening dat zij nog steeds niet goed kan navolgen op grond van welke hypothese/visie/ondersteunende waarnemingen de onderzoekers verwachten dat extra magnesium intake via het dieet bij chronische nierinsufficiëntie leidt tot minder ontstaan van vasculaire calcificatie. In de achtergrond wordt weliswaar allerlei informatie over dit onderwerp verstrekt, maar een synthese daarvan die leidt tot de onderbouwde visie van de onderzoekers op een aannemelijk werkingsmechanisme ontbreekt. Naar de mening van de DEC is die visie belangrijk voor het design van het experiment, en daarom noodzakelijk voor de toetsing van dit projectvoorstel. De onderzoekers beweren in hun antwoord dat zij niet geïnteresseerd zijn in een werkingsmechanisme, maar uit de beschrijving van de doelstelling blijkt het tegendeel: "In this research project, we aim to investigate the effects and underlying mechanisms of magnesium etc." Objective 3 en 5 zijn aan het onderzoeken van het mechanisme gewijd. De commissie verzoekt de aanvrager zijn visie op het werkingsmechanisme achter de hypothese toe te voegen.

Antwoord: Naar aanleiding van uw reactie, hebben we geconstateerd dat de formulering van de doelen in de project proposal inderdaad onvoldoende in overeenstemming met de hypothese was en we begrijpen dat deze formulering van de doelen voor onduidelijkheid heeft gezorgd. We hebben nu duidelijker het hoofddoel geformuleerd in de project proposal. Het hoofddoel sluit aan op de hypothese en is: bepalen of verhoging van de magnesium intake via het dieet bij ratten met chronische nierinsufficiëntie leidt tot minder ontstaan van vasculaire calcificatie en minder ontstaan van hypertrofie van het hart. We willen dus vaststellen of er een causaal verband hiertussen is. Uiteraard hebben de werkingsmechanismen wel onze interesse. Dit verklaart dan ook dat objective 3 en 5 zijn gericht op het bekijken van de moleculaire en genetische achtergrond van dit protectieve effect van magnesium. Hierbij zullen we gaan kijken of we verschillen zien in expressie en activiteit van genen en eiwitten die een rol spelen bij vasculaire calcificatie (zoals alkalisch fosfatase, bone morphogenetic protein-2, matrix Gla proteïne, osteonectin) en magnesium transport (zoals TRPM7). Er zijn veel mogelijke theorieën voor het werkingsmechanismen van magnesium op het proces van vasculaire calcificatie. In onze reactie op uw brief van 17-3-2017 beschreven we een aantal mogelijke mechanismen: een direct remmend effect van extracellulaire magnesiumionen op de vorming van hydroxyapatiet kristallen, remmen van calciumkanalen waardoor de overmatige calciuminflux in de gladde spiercellen afneemt, een effect via binding aan de calcium-sensing receptor, of een intracellulair effect van magnesium op het calcificatieproces, waarbij een mogelijk intracellulair effect zou kunnen optreden via remming van de expressie van bot-achtige genen. Er zijn dus veel mogelijkheden en op voorhand kunnen we niet 1 specifieke hypothese geven en ook niet de exacte cascade van achtereenvolgende processen benoemen. We achten het ook niet haalbaar om al deze mogelijkheden in de door ons voorgestelde studieopzet te exploreren. Dit is dan ook niet onze main objective. Wel willen we kijken welke genen en eiwitten mogelijk een rol spelen bij dit effect van magnesium door te kijken naar verschillen tussen de verschillende condities van

het magnesiumdieet. Dit zou kunnen helpen bij het vormgeven van toekomstige studies waarin het werkingsmechanisme verder kan worden uitgewerkt. Als we voor deze secundaire objectives dus een hypothese zouden moeten formuleren, dan zou dit zijn: Een hoger magnesiumdieet verandert expressie en activiteit van genen en eiwitten betrokken bij magnesiumtransport, osteogene differentiatie en vorming van een gecalcificeerde extracellulaire matrix.

- 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 voorbeelden 1 en 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 doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is onderzoeken of verhoogde magnesiuminname via de voeding leidt tot minder (cardio)vasculaire aandoeningen bij ratten met verminderde nierfunctie. Het uiteindelijke doel is het verminderen van (cardio)vasculaire aandoeningen bij mensen met chronische nierziekte (CKD). De aanvragers zullen de rol van Mg²⁺ in het ontstaan van calcificaties in bloedvaten en hartdysfunctie onderzoeken in een chirurgisch ratmodel voor CKD. Een hogere Mg-concentratie in het plasma biedt mogelijk bescherming tegen (cardio)vasculaire aandoeningen in dit diermodel. De experimenten zullen een eerste indicatie geven van het mogelijke werkingsmechanisme. In ander vervolgonderzoek (geen onderdeel van deze projectvergunning) zal dit werkingsmechanisme verder kunnen worden onderzocht, waardoor er eventueel aanknopingspunten voor de ontwikkeling van een interventie voor nierpatiënten gevonden worden. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project geen directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk

gemaakt dat de kennis van het effect van een verhoogde magnesiuminname op (cardio)vasculaire aandoeningen nog zeer beperkt is, en dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen die cardiovasculaire aandoeningen bij nierpatiënten kunnen verminderen of voorkomen, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen. De DEC is van mening dat het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd is 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 patiënten is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. Het voorkomen of verminderen van (cardio)vasculaire complicaties bij nierpatiënten (klinisch een groot probleem) kan bijdragen aan een betere kwaliteit van leven voor deze patiënten. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige ziekten, zoals chronische nierziekte, 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 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)

De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: Voor de meeste dieren wordt een standaard dodingsmethode gebruikt die in bijlage IV van de richtlijn is opgenomen. Voor een klein aantal dieren (7%) wordt een andere methode gevolgd (uitnemen van het hart onder terminale anesthesie) omdat dit noodzakelijk is voor de isolatie van hartcellen. Het ongerief voor de dieren neemt niet toe als gevolg van deze methode, omdat zij onder anesthesie zijn en niet meer bijkomen. De DEC is het eens met deze onderbouwing.

10. In de aanvraag wordt, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen afgeweken van de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU betreffende de huisvesting en verzorging van de dieren. De aanvrager geeft daarvoor de volgende reden(en): Wanneer uit de pilot studie blijkt dat het post-operatieve herstel na de nefrectomie wordt belemmerd doordat andere dieren de hechtingen beschadigen, dan zullen de experimentele dieren na de operatie overnacht individueel gehuisvest worden. Een beperkt aantal dieren zal maximaal 24 uur in een metabole kooi (dus individueel) worden gehuisvest, om de uitscheiding van electrolyten te kunnen meten. De DEC is van mening dat de gegeven redenen voldoende onderbouwing hiervoor zijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast doordat hun nierfunctie wordt beperkt, waarvan ze in de praktijk weinig last hebben, en door het instrumentele gebruik dat inherent is aan dierproeven.
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 ervaring met dit model ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De rol van magnesiuminname in het voorkomen of verminderen van cardiovasculaire complicaties bij nierpatiënten kan alleen met proefdieren worden onderzocht, omdat hier complexe interacties tussen organen en regulatoire mechanismen bij betrokken zijn.
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 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. Er wordt adequate pijnstilling toegepast rond de operaties, de dieren worden verdoofd voor handelingen waarvoor dit is vereist, en ze krijgen voldoende tijd om te herstellen van de handelingen. Individuele huisvesting wordt tot een minimum beperkt. De DEC is er daarom van 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. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden.

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 niet vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Voor het behalen van de doelstelling is het gebruik van deze dodingsmethode noodzakelijk (zie onderdeel C9 van dit advies).

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 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 indirect 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. Mensen met chronische nierziekte (CKD) hebben een grote kans om te overlijden aan cardiovasculaire complicaties, o.a. door calcificaties en hartfalen. De resultaten van dit project zullen duidelijk maken of calcificaties en hartfalen in de gebruikte diermodellen kunnen verminderen door hogere magnesiuminname, en er zal een eerste indicatie van het werkingsmechanisme worden verkregen. Wanneer daar aanleiding voor is kan in vervolgonderzoek het werkingsmechanisme worden bestudeerd, op basis waarvan uiteindelijk een nieuwe interventie voor nierpatiënten kan worden ontwikkeld. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van nieuwe therapieën die het verhoogde risico op cardiovasculaire aandoeningen bij nierpatiënten kunnen verminderen van substantieel belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: onderzoeken of verhoogde magnesiuminname via de voeding leidt tot minder (cardio)vasculaire aandoeningen bij ratten

met verminderde nierfunctie. Het uiteindelijke doel daarvan is het verminderen van (cardio)vasculaire aandoeningen bij mensen met chronische nierziekte (CKD). 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. Hoewel er sprake is van een dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief.

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 AVD1030020172225 Bijlagen 2

Datum 19 juni 2017 Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 juni 2017. Het gaat om uw project "The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020172225. 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:

19 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172225

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
19 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172225

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
19 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172225

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: 14 juli 2017
Geplande einddatum: 14 augustus 2019
Titel project: The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment
Titel niet-technische samenvatting: Kan extra magnesium de ontwikkeling van problemen aan hart- en vaten bij chronische nierziekte verminderen?
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]


Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: 
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 16 juni 2017

Datum:
19 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172225



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Grooteplein 29

Postbus 9101, [REDACTED]

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
AVD1030020172225

Bijlagen

2

Datum 19 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 juni 2017

Vervaldatum: 19 juli 2017

Factuurnummer: 172225

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220 CDL

projectnummer: 2016-0096 Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

[REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020172225	€ 1035,00

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, [REDACTED]

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
AVD1030020172225

Datum 23 juni 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment" met aanvraagnummer AVD1030020172225. 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

Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin de Vervanging beter is beschreven?
Kunt u hierin ook 'uit het experiment gehaald worden' (4.4) vervangen door iets anders, bijvoorbeeld 'worden gedood'?

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

Datum:

23 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172225



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: AVD1030020172225

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:

23 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172225

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

Aan de CCD
t.a.v. [REDACTED],

In reactie op uw brief van 23 juni (referentie Aanvraagnummer AVD1030020172225) sturen we hierbij de aangepaste NTS voor dit project toe.

De geconstateerde onduidelijkheden [uit AanhoudenBeoordelenbrief: Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin de Vervanging beter is beschreven? Kunt u hierin ook 'uit het experiment gehaald worden' (4.4) vervangen door iets anders, bijvoorbeeld 'worden gedood'?] zijn begrepen en de gevraagde aanpassingen zijn gemaakt.

Bedankt voor uw hulp, mede namens de onderzoeker ([REDACTED]).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, [REDACTED]

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
AVD1030020172225

Bijlagen

1

04 JUL 2017

Datum 3 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment" met aanvraagnummer AVD1030020172225. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 28 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS

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 "The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 juli 2017 tot en met 14 augustus 2019.

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 16 juni 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:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172225

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, [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 juli 2017 tot en met 14 augustus 2019, voor het project "The role of magnesium in cardiovascular disease in chronic renal impairment" met aanvraagnummer AVD1030020172225, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar. Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 28 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 juni 2017, ontvangen op 16 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 28 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Reduction of functional kidney volume + high dietary phosphate + different dietary magnesium, with measurements of vascular calcification and cardiac morphology and function				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	121	85% Matig 15% 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.

Aanvraagnummer:
AVD1030020172225

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:

AVD1030020172225

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 onvermijdelijk is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:

AVD1030020172225

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 human acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Inventaris Wob-verzoek W17-12										
nr.	document NTS 20172226	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x	x		
5	DEC-advies				x		x	x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
8	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
9	Adviesnota CCD		x							x
10	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.	Naam instelling of organisatie: Universiteit Maastricht Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED] KvK-nummer: 50169181
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer: Minderbroedersberg 4-6 Postbus: 616 Postcode en plaats: 6200 MD Maastricht IBAN: NL04 INGB 0679 5101 68 Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Maastricht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters: [REDACTED] Functie: [REDACTED] Afdeling: [REDACTED] Telefoonnummer: [REDACTED] E-mailadres: [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters: [REDACTED] Functie: [REDACTED] Afdeling: [REDACTED] Telefoonnummer: [REDACTED] E-mailadres: [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 8 - 2017
- Einddatum 1 - 8 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Vervetting en ontsteking van de lever speelt een oorzakelijke rol in de ontwikkeling van spieratrofie.
- 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.
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

Maastricht

Datum

15 - 6 - 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.

[REDACTED]

B. Background

The liver is an endocrine organ and plays a major role in metabolism. The liver is the largest internal organ in the body and is placed centrally, both anatomically and functionally, to influence whole-body metabolism. The liver exerts many of its effects by inter-organ cross-talk; the liver produces proteins and secretes these into the systemic circulation. The liver expresses ~7000 unique proteins and about 25% of these proteins are also detected in the plasma. These include proteins involved in complement and coagulation, in fatty acid, purine and pyruvate metabolism, in gluconeogenesis and glycolysis, in protein ubiquitination, and in insulin, interleukin-4, and growth factor signaling (9). As such, the liver plays an important role in regulating whole-body metabolism.

Hepatic steatosis is widely prevalent in the world, and is strongly associated with obesity. While it is normal to have some fat in the liver, hepatic steatosis refers to the excessive accumulation of lipid in the liver and is clinically defined as triglyceride content exceeding 5% of the liver weight (10). Hepatic steatosis is often viewed as a benign and reversible manifestation; however, it is the earliest stage of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and it can progress to other, more severe stages of NAFLD, which include non-alcoholic steatohepatitis (NASH, or inflamed liver), fibrosis, cirrhosis and liver carcinoma (11-14). Hepatic steatosis is widely prevalent in the world (14); it is present in ~20-40% of adults (15), in up to ~70% of the overweight population (16, 17), and in more than 90% of morbidly obese individuals (18), showing that obesity is a major risk factor for the development of hepatic steatosis.

[REDACTED]

References:

1. Park SW et al. Accelerated loss of skeletal muscle strength in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. *Diabetes Care* 2007;30:1507-1512.
2. Guerrero N et al. Premature loss of muscle mass and function in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2016;117:32-38.
3. Kim TN et al. Prevalence and determinant factors of sarcopenia in patients with type 2 diabetes: the Korean Sarcopenic Obesity Study (KSOS). *Diabetes Care* 2010;33:1497-1499.
4. Leenders M et al. Patients with type 2 diabetes show a greater decline in muscle mass, muscle strength, and functional capacity with aging. *J Am Med Dir Assoc* 2013;14:585-592.
5. Veronese N et al. Associated with an Increased Risk of Incident Type 2 Diabetes in the Elderly. *J Am Med Dir Assoc* 2016.
6. Landi F et al. Sarcopenia as a risk factor for falls in elderly individuals: results from the iSIRENTE study. *Clin Nutr* 2012;31:652-658.
7. Fielding RA et al. Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* 2011;12:249-256.
8. Hashimoto Y et al. The relationship between hepatic steatosis and skeletal muscle mass index in men with type 2 diabetes. *Endocr J* 2016.
9. Lai KK et al. Comprehensive and quantitative proteome profiling of the mouse liver and plasma. *Hepatology* 2008;47:1043-1051.
10. Hoyumpa AM et al. Fatty liver: biochemical and clinical considerations. *Am J Dig Dis* 1975;20:1142-1170.
11. Zoller H et al. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1761-1766.
12. Loomba R et al. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10:686-9
13. Starley et al. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 2010;51:1820-1832.
14. Younossi ZM et al. Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence and Outcomes. *Hepatology* 2015.
15. Browning JD et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-1395.
16. Bellentani S et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 2000;132:112-117.
17. Luyckx FH et al. Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastroplasty. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:222-226.
18. Silverman JF et al. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 1990;85:1349-1355.
19. Abdul-Ghani MA et al. Strong association between insulin resistance in liver and skeletal muscle in non-diabetic subjects. *Diabet Diabet Med* 2008;25:1289-1294.
20. Larson-Meyer DE et al. Intrahepatic and intramyocellular lipids are determinants of insulin resistance in prepubertal children. *Diabetologia* 2011;54:869-875.
21. [REDACTED]
22. Pal D et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* 2012;18:1279-1285.
23. Kumar KG et al. Identification of adropin as a secreted factor linking dietary macronutrient intake with energy homeostasis and lipid metabolism. *Cell Metab* 2008;8:468-481.
24. Misu H et al. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010;12:483-495.
25. Carias S et al. Nonalcoholic steatohepatitis is strongly associated with sarcopenic obesity in patients with cirrhosis undergoing liver transplant evaluation. *J Gastroenterol Hepatol* 2016;31:628-633.
26. Lai JC et al. Functional decline in patients with cirrhosis awaiting liver transplantation: Results from the functional assessment in liver transplantation (FrAILT) study. *Hepatology* 2016;63:574-580.
27. Kohno M et al. [15N]glycine metabolism in normal and cirrhotic subjects. *Biochem Med Metab Biol* 1990;43:201-213.
28. Marchesini G et al. Muscle protein breakdown in liver cirrhosis and the role of altered carbohydrate metabolism. *Hepatology* 1981;1:294-299.
29. Baumgartner RN et al. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* 1998; 147:755-763.

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?

[REDACTED]

[Redacted text]

3.3 Relevance

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

[Redacted text]

3.4 Research strategy

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

Background and aim: [Redacted text]

Approach: Different groups of mice will be fed different diets (see 3.4.2 for details) to induce 1) hepatic steatosis or 2) steatosis in combination with hepatic inflammation, which represent stage 1 and stage 2 of NAFLD, respectively. **Three weeks before being sacrificed, mice will receive a single IP injection with 0.02ml/g body weight of 70% deuterium oxide, and tap water will be replaced by 4% deuterium oxide enriched tap water.** After the diets, blood will be taken, and livers, muscle and other organs of interest will be excised. **Muscle will be used to quantify rates of muscle protein synthesis over the last 3 weeks in a free-living environment.** [Redacted text]

- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]

[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.

Procedure used in mice

Procedure = diet, followed by excision of organs, followed by euthanasia

We are using C57Bl6 mice because feeding of a high-fat diet induces obesity in these mice and eventually insulin resistance, fatty liver, inflammation and 'pre-diabetes'. We have worked with this model for many years (1). Male mice will be used because female mice have large fluxes in reproductive cycle hormones, which profoundly affect the metabolic processes under investigation (2-4).

- Group 1: young mice will be ordered a few weeks after birth. Upon arrival in the animal facility, they will be put on a chow diet (control group) or high fat diet for 2-3 months. (The high fat diet will induce hepatic fat deposition (NAFLD stage 1)). **Three weeks before being sacrificed, mice will receive a single IP injection with 0.02ml/g body weight of 70% deuterium oxide and tap water will be replaced by 4% deuterium oxide enriched tapwater.**
- Group 2: young mice will be ordered a few weeks after birth. Upon arrival in the animal facility, they will be put on a chow diet (control group) or high fat diet ~12 months (this diet will drive hepatic fat deposition and inflammation (NAFLD stage 2)). **Three weeks before being sacrificed, mice will receive a single IP injection with 0.02ml/g body weight of 70% deuterium oxide and tap water will be replaced by 4% deuterium oxide enriched tapwater.**
- Group 3: young mice will be ordered a few weeks after birth. Upon arrival in the animal facility, they will be put on a chow diet (control group) or on a lard-based high-fat diet that is additionally supplemented with fructose and cholesterol for 8-10 months (this diet will drive hepatic fat deposition and inflammation (NAFLD stage 2)). **Three weeks before being sacrificed, mice will receive a single IP injection with 0.02ml/g body weight of 70% deuterium oxide and tap water will be replaced by 4% deuterium oxide enriched tapwater.**

All mice will be used for the same experiments. Specifically, mice will be anaesthetized. Blood will be taken, and organs of interest will be excised.

1. [REDACTED]
2. Blenck CL et al. The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res.* 2016; 118: 1294-312
3. Yasuda N et al. Sex-based differences in skeletal muscle function and morphology with short-term limb immobilization *J Appl Physiol* (1985). 2005
4. Carson et al. Effects of sex steroids on bones and muscles: similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone.* 2015
5. Ballestri et al. NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Adv Ther*, 2017

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.

[REDACTED]

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	Diet, followed by excision of organs
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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	Diet, followed by excision of organs

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.

Procedure = Diet, followed by excision of organs, followed by euthanasia

- Group 1: Upon arrival in the animal facility, mice will be put on a chow diet (control group) or high fat diet for 2-3 months. The high fat diet will induce a fatty liver. **Three weeks before being sacrificed, mice will receive a single IP injection with 0.02ml/g body weight of 70% deuterium oxide and tap water will be replaced by 4% deuterium oxide enriched tapwater.**
- Group 2: Upon arrival in the animal facility, mice will be put on a chow diet (control group) or high fat diet ~12 months. This high fat diet will induce a fatty, inflamed liver. **Three weeks before being sacrificed, mice will receive a single IP injection with 0.02ml/g body weight of 70% deuterium oxide and tap water will be replaced by 4% deuterium oxide enriched tapwater.**
- Group 3: Upon arrival in the animal facility, mice will be put on a chow diet (control group) or on a lard-based high-fat diet that is additionally supplemented with fructose and cholesterol for 8-10 months. This high fat diet will induce a fatty, inflamed liver. **Three weeks before being sacrificed, mice will receive a single IP injection with 0.02ml/g body weight of 70% deuterium oxide and tap water will be replaced by 4% deuterium oxide enriched tapwater.**

Note, mice from different groups have different ages, and experiments will be performed at different time points. Therefore, each group needs its own control mice.

All mice will be used for the same experiments. Specifically, mice will be anaesthetized. Blood will be taken by cardiac puncture, and liver and other organs that may be of interest will be excised. Hearts will be removed to ensure terminal euthanasia.

As indicated in the previous section, we will need 10 mice per group and per experiment. There are 4 experiments per outcome parameter. (= proteomics analysis, protein synthesis, protein breakdown, myotube diameter). Per group, we will include 5 extra mice to account for drop-out.

Thus: total number of mice for entire project = 270 mice

Group 1:

Included in the study 6-10 weeks after birth.

They will be put on a chow diet (n=45) or high fat diet (n=45) for 2-3 months.

→ [REDACTED]

Group 2:

Included in the study 6-10 weeks after birth.

They will be put on a chow diet (n=45) or high fat diet (n=45) for ~12 months.

→ [REDACTED]

Group 3:

Included in the study 6-10 weeks after birth.

They will be put on a chow diet (n=45) or on a lard-based high-fat diet that is additionally supplemented with fructose and cholesterol (n=45) for 8-10 months

→ [REDACTED]

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.

[REDACTED]

Reduction: Livers will need processing after removal from the mice. We will optimize this processing technique before we start our study. We will try to minimise the number of mice further by performing optimization experiments and searching for the maximal amount of conditioned media that we can generate per mouse. For this purpose, we will use the livers of dead mice. This can reduce our mouse numbers further.

Refinement: Our proposed experiments in mice are based on previous studies [REDACTED]. Further experiments concerning the molecular basis of protein action will be undertaken using in vitro approaches.

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

on the environment.

Mice will be monitored by animal house staff and the investigator for general signs of wellbeing including growth rates, feeding, drinking and activity. The high fat feeding proposed here is a widely used procedure and has been routinely applied by our group. During their diets, mice will be monitored regularly:

We do not expect loss of body weight or change in behaviour due to our intervention (i.e. the diet). Nevertheless, we will use a welfare journal to track the development of the mice. If any of those adverse signs would occur, mice will be euthanized and the cause will be investigated. Skin conditions and itchiness will be treated with a cream.

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Possibly skin conditions and/or itchiness.

Explain why these effects may emerge.

Due to a high fat diet

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

Skin conditions due to high fat diet are rare. If they would occur, they will be treated with a cream.

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.

- Loss of body weight: 10% loss overnight or sustained weight loss over 10 days without stabilisation after 7 days (>15% of starting weight).
- Change in behaviour: Hunched posture, immobility. These behavioural changes normally affect food intake and body weight and will help assess animal suffering.

We do not expect loss of body weight or change in behaviour due to our intervention (i.e. the diet). Nevertheless, we will use a welfare journal to track the development of the mice. If any of those adverse signs would occur, mice will be euthanized and the cause will be investigated. Skin conditions and itchiness will be treated with a cream. If there is no improvement, and the mouse is possibly stressed, it will be sacrificed.

Indicate the likely incidence.

<5%

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').

Mild

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.

Liver and other organs of interest will be excised, and blood will be taken

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 PV 2017-002/ [REDACTED]

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:** *Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy.*
3. **Titel van de NTS:** *Vervetting en ontsteking van de lever speelt een oorzakelijke rol in de ontwikkeling van spieratrofie.*
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; 11-05-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken; 19-05-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbrekingen van 25-05-2017 tot en met 01-06-2017; 06-06-2017 tot en met 12-06-2017
 - 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 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; 25-05-2017

Gestelde vragen;

De DEC-UM verzoekt u een flow-chart toe te voegen.

[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

3.4.2

1. Kunt u de reden van de ongeschiktheid van vrouwelijke dieren in uw onderzoek wat uitgebreider omschrijven c.q. preciseren?
2. U gebruikt kennelijk reeds beproefde voedingsproeven teneinde NAFLD stadium 1 of 2 op te wekken en laatstgenoemde al dan niet met leverontsteking. Controleert u in uw onderzoek *ex vivo* nog of er sprake is van insuline-resistentie of acht u dat niet noodzakelijk? In het verlengde hiervan of u ook *ex vivo* T2D in beeld brengt of dienen hiervoor (mede) de afgenomen bloedmonsters?
3. Krijgen vrouwen geen NAFLD? Zou het niet juist vanwege die verschillen interessant zijn om beide seksen te includeren?

Antwoord vraag 1 + 3: Wij kiezen ervoor om geen vrouwtjesmuizen te includeren om verschillende redenen:

- 1) Vrouwen en mannen verschillen behoorlijk in spiermassa, in hormoonlevels, alsook in de mogelijkheid om spiermassa aan te maken en te verliezen. Deze verschillen tussen mannen en vrouwen zullen leiden tot aanzienlijke variatie in ons onderzoek, wat nefast kan zijn voor de studie. (referenties 2-4 zijn toegevoegd in het ‘project proposal’, en zijn ook weergegeven onderaan deze paragraaf).
- 2) Vrouwen zijn tot op zekere hoogte beschermd tegen het krijgen van NAFLD (deels door de beschermende werking van oestrogeen), waardoor de ernst van NAFLD kan verschillen tussen mannetjes en vrouwtjes muizen. Ook dit zal tot ongewenste variatie leiden (referentie 5)

3) [Redacted text block]

1. Blenck CL et al. The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res.* 2016; 118: 1294-312
2. Yasuda N et al. Sex-based differences in skeletal muscle function and morphology with short-term limb immobilization *J Appl Physiol* (1985). 2005
3. Carson et al. Effects of sex steroids on bones and muscles: similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone.* 2015
4. Ballestri et al. NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Adv Ther*, 2017

Antwoord vraag 2: Insuline resistentie zal niet meer onderzocht worden omdat bekend is dat dit zeker aanwezig zal zijn. Insuline resistentie in de lever treedt namelijk al enkele dagen op na het starten van een hoog vet dieet en in de spier zal dit optreden na ~3 weken. (zie referentie: Tuner N. et al. Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. *Diabetologia*. 2013). De muizen in de huidige studie zullen minstens 8 weken op een hoog-vet dieet staan, en insuline resistentie zal dus zeker aanwezig zijn. Daarnaast zou de vraag of insuline resistentie al dan niet aanwezig is, voor dit onderzoek ook niet van het grootste belang zijn. [REDACTED]

3.4.3

1. U wilt twee groepen met hoog-vet dieet includeren die beide zouden moeten leiden tot steatose en inflammatie in de lever. Uw doelstelling is echter het vinden van stoffen [REDACTED]
2. [REDACTED] motiveert u met de leeftijd van de dieren. Deze dieren krijgen echter een normaal dieet. Verwacht u echt grote verschillen tussen de controledieren van groepen 1, 2 en 3?

Antwoord vraag 1: Beide diëten zijn veel gebruikte modellen om NASH te induceren. Het 1^e NASH model leidt tot minder ernstige inflammatie en minder lever fibrose. Het 2^e NASH model gaat gepaard met ernstigere leverinflammatie, hepatocellulaire ballooning, and lever fibrose (zie ook referentie: Ibrahim et al. Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: eat, delete, and inflame, *Dig Dis Sci*, 2016). Door beide modellen te gebruiken, kunnen we een lichtere vorm van NASH vergelijken met een zwaardere vorm van NASH. In die zin hebben we dus eigenlijk 4 stadia, gaande van gezonde lever, naar vette lever, naar milde vorm van NASH, naar zwaardere vorm van NASH.

Antwoord vraag 2: [REDACTED]

3.4.4 appendix A: Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. U houdt een simpele onderzoeksstrategie aan. Echter, u wilt onderzoeken welke stoffen de vervette lever uitscheidt, die tot spieratrofie zouden kunnen leiden. Zou u niet meer validatiestappen includeren? Te denken valt bijvoorbeeld aan een aantal keren een insuline clamp studie om te monitoren of de dieren insulineresistentie ontwikkelen. Daarnaast kunt u de levers pas gebruiken wanneer u aantoon dat ze inderdaad vervet (en in inflammatoire toestand zijn)?

2. Gaat u ook de mate van spieratrofie bij de muizen zelf meenemen in de studie? Zo ja, hoe gaat u dat doen?
3. Bij de procedure: De wijze van het doden van de dieren zoals beschreven, is voor redactie vatbaar.
4. De DEC-UM vindt het drop-out percentage van 10-12% hoog. Het betreft uitsluitend het verwerken van weefsels. Waar is dit percentage op gebaseerd en hoe denkt u dit verder te kunnen reduceren?

Antwoord vraag 1: Zoals wij bij vraag 3.4.2, vraag 2 beargumenteerd hebben, willen wij niet onderzoeken of de dieren insuline resistent zijn. Dat is a) niet belangrijk voor ons onderzoek en b) al overtuigend vastgesteld in tal van eerdere onderzoeken. Wij hebben wel wat ervaring met insuline clamps bij muizen, maar de procedure is niet zo straight forward als in deze vraag gesuggereerd wordt. Muizen kunnen sterven tijdens de operatie (het plaatsen van cathethers is specialistenwerk), en ze worden bovendien ook opgeofferd op het einde van de clamp. Dit zou tot een hoger aantal muizen leiden dat geincludeerd zou moeten worden in de studie. Bovendien levert een clamp enorme stress en ongemak op voor de muizen; leidt het tot een hoge workload voor ons team, en zou het geen vragen beantwoorden die in ons project van belang zouden zijn. Tot slot is de afdeling waar ons team werkt niet ingericht op het uitvoeren van muizenclamps. Wij wensen daarom met klem om geen muizen clamps uit te voeren. Wat gemakkelijker zou kunnen is om een glucose tolerantie test uit te voeren. Dat geeft veel minder stress en ongemak voor de muizen en dat zou door ons team prima uit te voeren zijn, maar ook hier zien we niet de meerwaarde van in.

We zullen wel gaan onderzoeken in welke mate leververvetting en inflammatie is opgetreden. Dat dit optreedt staat buiten twijfel, maar we willen dit kwantificeren voor publicatie doeleinden. We hoeven hier geen extra muizen voor te includeren. Uit elke lever-lob snijden we één mooie 'core' dat we vervolgens gaan gebruiken voor het snijden van slices. Na het uitsnijden van de core is er altijd nog wel wat restweefsel over dat we zullen gebruiken ter validatie van vervetting en inflammatie.

Antwoord vraag 2: Dat is niet de bedoeling want dit zal ons geen bijkomend inzicht verschaffen. Spieratrofie in vivo en in vitro zijn twee compleet verschillende dingen. Naast de lever zijn er in vivo tal van andere factoren die ook van invloed kunnen zijn op het al dan niet hebben van atrofie: de mate van activiteit van de muizen, de voeding van de muizen, het gewicht van de muizen, het effect van andere organen (bv van vetweefsel is eerder aangetoond dat het eiwitten uitscheidt die kunnen leiden tot spieratrofie). Het doel van de in vitro experimenten is om in een gecontroleerde en geïsoleerde setting te onderzoeken wat de secretieproducten van de lever voor effect heeft op spiercellen.

Antwoord vraag 3: Het is ons niet helemaal duidelijk wat wij moeten herzien. We willen de dieren niet doden voor we de organen eruit halen. We willen de dieren eerst onder narcose brengen zodat we zo snel en vers mogelijk de organen eruit kunnen halen, alsook een hoeveelheid bloed. Bij het breken van de nek is het verkrijgen van bloed ernstig verstoord of zelfs niet mogelijk.

Antwoord vraag 4: We begrijpen dat deze drop-out hoog lijkt, en mogelijk is dit van onze kant uit niet voldoende beargumenteerd. Er wordt bij het bepalen van deze 10-12% rekening gehouden met verschillende factoren. Wij hebben in het verleden dropout gehad door verschillende redenen.

Antwoord vraag 7: Dat klopt. Het is logischer om 2x de standaarddeviatie onder het gemiddelde van de andere muizen als maatstaf te gebruiken. We zullen hoe dan ook de gewichtstoename checken. Wanneer een muis in gewicht toeneemt, en opeens niet meer bijkomt (of zelfs lichtjes afvalt), zal dat een reden zijn om deze muis extra in het oog te houden.

Antwoord vraag 7: zoals in '3.4.4, appendix D, vraag 5' beantwoord zullen de muizen insuline resistentie ontwikkelen, maar geen echte diabetes.

- Datum antwoord; 01-06-2017
- Verstreckte antwoorden; *zie hierboven*.
- 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.

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 fundamenteel 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.

[Redacted text block]

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel wetenschappelijke project, dat gericht is op het ontdekken van causale relaties tussen [redacted] zijn de proefdieren, de onderzoekers en de biomedische wetenschappen.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de voortdurende dieetmaatregelen en de narcose, uitname van de lever en opoffering aan het eind van de proef. De proefdieren zullen licht ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen biomedische wetenschappelijke kennis verkrijgen over het verband tussen leververvetting en -ontsteking en spieratrofie en deze kennis delen met de betreffende-wetenschappelijke gemeenschap.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Leververvetting en -ontsteking komen veel voor. Kennis over de rol van [redacted], kan bijdragen aan de ontwikkeling van therapeutische strategieën om spieratrofie te voorkomen of behandelen.

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.

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.

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.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door: de voortdurende dieetmaatregelen en de narcose, uitname van de lever en opoffering aan het eind van de proef.

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.

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.

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.

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 zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse.

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.

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.

De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke 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 de proeven met dergelijke dieren 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.

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 onderzoeken [REDACTED] de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project *Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy?**

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

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *licht nadeel.*

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Algemeen: *relevante groei van medisch-wetenschappelijke kennis.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving, hier vooral van de onderzoekers en de biomedische wetenschappen en op termijn mogelijk patiënten en ouderen, binnen het project "Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na licht ongerief.

De dieren worden door de experimenten in lichte mate in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de continue dieetmaatregelen gedurende de proeven, en de narcose, leveruitname en opoffering aan het eind van de proef.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter bijdragen aan de ontwikkeling van kennis over het effect van de ██████████

Deze kennis kan van waarde blijken bij het voorkomen en behandelen van spieratrofie bij patiënten en ouderen. Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM het onderhavige onderzoek van potentieel substantieel belang.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

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

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het onderzoeken van ██████████

de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy?" 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 potentieel substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet logisch en helder aansluit bij de aangegeven doelstelling 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.

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. De DEC-UM acht de argumentatie van de onderzoekers om in dit project louter voor mannelijke proefdieren te kiezen steekhoudend.

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 "Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy" 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.

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
AVD1070020172226

Bijlagen

2

Datum 19 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 juni 2017. Het gaat om uw project "Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1070020172226. 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:

19 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1070020172226

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
19 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020172226

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 INGE 0679 5101 68
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Maastricht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



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

Datum:

19 juni 2017

Aanvraagnummer:

18070020172226

Over uw project

Geplande startdatum:

1 augustus 2017

Geplande einddatum:

1 augustus 2022

Titel project:

Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy.

Titel niet-technische samenvatting:

Vervetting en ontsteking van de lever speelt een oorzakelijke rol in de ontwikkeling van spieratrofie.

Naam DEC:

DEC-UM

Postadres DEC:

Postbus 616, 6200 MD Maastricht

E-mailadres DEC:

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 568,-

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:

Maastricht

Datum:

15 juni 2017



> 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
AVD1070020172226

Bijlagen

2

Datum 19 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 juni 2017

Vervaldatum: 19 juli 2017

Factuurnummer: 172226

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1070020172226	€ 568,00

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

[Redacted]

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
AVD1070020172226

Datum 23 juni 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 15 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy." met aanvraagnummer AVD1070020172226. 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

Kunt u een nieuwe NTS sturen, waarin de woorden 'metabolisme' en [Redacted] worden uitgelegd of vervangen door andere woorden? Kunt u ook de spelfout (Ons doel is om te onderzoeken hoe de secretie van eiwitten veranderd... -> verandert) aanpassen? Kunt u tot slot 'mild ongerief' en 'categorie 1' aanpassen naar 'licht ongerief'?

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:

23 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1070020172226

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



University Maastricht

*Instantie voor
Dierenwelzijn*



Aan: CCD

Bezoekadres

Universiteitssingel 50
6229 ER Maastricht

Postadres

Postbus 616 box 51
6200 MD Maastricht

Uw kenmerk

-

Ons kenmerk

AV2017-048

Doorkiesnummer

81006

Maastricht

06-07-2017

Geachte heer, mevrouw,

Bijgesloten treft u een verzoek tot wijzigingen aan die betrekking hebben op het PV en appendix 2017-002 behorende bij beschikingsnummer AVD1070020172226.

Dit verzoek (d.d. 05-07-2017) is door de Instantie van Dierenwelzijn-UM behandeld, en op basis van de onderbouwing ervan en het feit dat er geen toename zal zijn in het ongerief of aantallen dieren, acht de IvD-UM dit een aanpassing in het PV die in de categorie 'melding' valt. Naast het verzoek plus onderbouwing treft u het aangepaste PV en bijlage aan.

Hoogachtend,



Instantie voor Dierenwelzijn



> 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

AVD1070020172226

Bijlagen

1

Datum 18 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy." met aanvraagnummer AVD1070020172226. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 5 en 6 juli 2017 heeft u uw aanvraag gewijzigd. Dit betrof een nieuwe NTS en een aanpassing op het projectvoorstel en Bijlage Dierproeven.

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 "Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy." 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.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 15 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

in
A

Bijlagen:

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

Datum:
18 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020172226



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 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Lipid accumulation and inflammation in the liver is causally related to the development of muscle atrophy." met aanvraagnummer AVD1070020172226, 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 15 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 juli 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 juni 2017, ontvangen op 15 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 5 en 6 juli 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Diet, followed by excision of organs				
	Muizen (Mus musculus) /	270	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 worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van

Aanvraagnummer:
AVD1070020172226

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:
AVD1070020172226

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 onvereenigbaar 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:
AVD1070020172226

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 W17-12									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS20172245	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x		x	
5	DEC-advies				x	x		x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x	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 11500 <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	UMC Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30244197
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	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 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.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters

Dhr. Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag

Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

Nee > Ga verder met vraag 3

Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 1 - 8 - 2017

Einddatum 31 - 12 - 2018

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Lange termijn onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor bloedvaten van 1.8 tot 2.5 mm

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor kleinere bloedvaten

- 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.
 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 ondertekende 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.

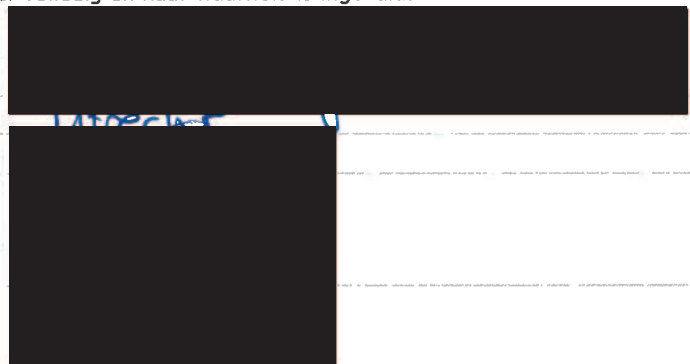
Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening





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.

Dit project vormt een belangrijk onderdeel van ons onderzoek naar de ontwikkeling van een simpelere, veiligere en makkelijkere versie van de huidige ELANA techniek. De ELANA techniek is een techniek die speciaal ontwikkeld is voor afwijkingen van de bloedvaten in het hoofd. ELANA staat voor Excimer Laser Assisted Non-occlusive Anastomosis. De ELANA anastomose techniek is bedacht en ontworpen door het team van de afdeling Neurochirurgie aan het UMC Utrecht.

De ELANA techniek is een bypass techniek in het hoofd waarbij het ontvangende vat niet afgesloten hoeft te worden tijdens het maken van de ELANA anastomose. Dit is een unieke methode. Bij deze methode wordt er een donorvat uit het been gehaald. In het oorspronkelijke ontwerp wordt dit donorvat vervolgens met 8 hechtingen aan de ELANA ring gemaakt. Deze ring met daaraan het donorvat wordt met 8 hechtingen op het ontvangende vat in het hoofd vastgemaakt. Daarna komt er een laser die door het donorvat wordt geschoven en een gat maakt in het ontvangende vat. Dit wordt gedaan terwijl de bloedstroom niet wordt onderbroken. Deze techniek wordt toegepast op bloedvaten in het hoofd die soms wel 9 cm diep liggen. Deze techniek is echter alleen toepasbaar bij bloedvaten met een diameter van 2.6 tot 3 mm (dit zijn de grootste diameters bloedvaten in het hoofd). Om een duidelijker beeld te krijgen zie de extra bijgevoegde bijlage en het filmpje op de website <http://www.elana.com>.

Sommige mensen hebben een afwijking aan de bloedvaten. Dit kan bijvoorbeeld voorkomen in het hoofd. Zo'n afwijking kan bijvoorbeeld een aneurysma, dat wil zeggen een uitstulping in de wand van een slagader, zijn.

Van alle volwassenen heeft 3% een hersenaneurysma, wat neerkomt op 300.000 mensen in Nederland (Bron: <https://www.vriendenumcutrecht.nl/Projecten/hersenen/hersенbloeding/?gclid=CPbf-Yqv5s8CFeXbcgodcmL2A>). Wereldwijd sterven er bijna 500.000 mensen aan een aneurysma (Bron: <http://www.brainaneurysm.com/TopStories/exec/didyouknow>).

Ook kan er door verschillende andere oorzaken een beschadiging van de vaatwand optreden (verkalking, ophoping van cholesterol, stolselvorming, etc.) wat een slechte doorbloeding of zelfs afsluiting tot gevolg heeft (ischemie: onvoldoende doorbloeding). In 2014 overleden in Nederland 9.383 personen als gevolg van een beroerte (verstoring van doorbloeding van de hersenen) (Bron: <https://www.volksgezondheidszorg.info/onderwerp/beroerte/cijfers-context/sterfte#!node-sterfte-beroerte-naar-type>). De bloedvaten in het hoofd zijn zeer moeilijk te bereiken. Bij een dergelijke operatie kunnen de hersenen beschadigd raken en kan er uitval van een of meer gebieden plaatsvinden. Door deze complicerende factoren zijn niet alle patiënten te behandelen.

Een aneurysma in de hersenen bevindt zich meestal op de splitsing van twee slagaders, meestal aan de onderkant van de hersenen of hersenstam. Als een aneurysma te groot wordt kan deze gaan scheuren en zal er een hersenbloeding ontstaan. Een aneurysma wordt vaak pas vastgesteld na het ontstaan van verschillende symptomen. Een groot aneurysma kan neurologische uitval- of prikkelingsverschijnselen veroorzaken zonder te bloeden, doordat het aneurysma als een gezwel tegen de hersenen, de hersenstam of de hersenzenuwen aandrukt. Een aneurysma kan worden verholpen met clipping of coiling. Bij clipping wordt er een klemmetje op de hals van het aneurysma geplaatst, zodat de bloedtoevoer naar de uitstulping is afgesloten. Als dat gebeurt, kan er geen bloeding van het aneurysma meer optreden (Bron: The effect of coiling versus clipping of ruptured and unruptured cerebral aneurysms on length of stay, hospital cost, hospital reimbursement, and surgeon reimbursement at the shands healthcare neurovascular center at the university of florida; Hoh B.L.; Neurosurgery, feb 2009). Bij coiling wordt een vaatkatheter via de liesslagader naar de monding van het aneurysma gebracht. Via deze katheter worden spiraaltjes van platinum in het aneurysma gebracht, die daarin opkrullen en de holte van het aneurysma geheel opvullen, waardoor deze afgesloten is van de bloedtoevoer en niet meer opnieuw kan gaan bloeden. De platinum draad vult het aneurysma. Hierdoor verandert de bloedstroom, waardoor het aneurysma tromboseert (Bron: Surgery following endovascular coiling of intracranial aneurysms; Thornton J.; Surg. Neurol. 54: 352-60, 2000).

In 1-3 % van de gevallen kan een aneurysma niet met clipping of coiling behandeld worden. Redenen hiervoor zijn bijvoorbeeld: 1. een te groot aneurysma (groter dan 2.5 cm), 2. een aneurysma dat te diep in de hersenen ligt, 3. de hals van het aneurysma te breed is, 4. er komen zijtakjes uit het aneurysma of 5. het aneurysma te kwetsbaar is. Bij 1-3% van de patiënten is clipping of coiling niet mogelijk en is een

bypass het laatste redmiddel. Bij een bypass wordt langs het aneurysma een vaatomleiding aangebracht, waarlangs de aanvoer van zuurstofrijk bloed plaats kan vinden. Clipping en coiling zijn goede behandelopties voor oppervlakkige vaten, maar niet toe te passen bij dieper gelegen vaten. De conventionele bypass is een goed alternatief, maar hierbij moet het vat tijdelijk worden afgesloten, waardoor onder andere zuurstoftekort kan ontstaan. De beste methode is om een bypass te maken, zonder dat het bloedvat wordt afgesloten maar waarbij het aneurysma wel kan worden verwijderd. Deze eigenschappen heeft de ELANA techniek.

De huidige ELANA techniek vereist een perfecte hechttechniek van de uitvoerder. Toch kan de ELANA techniek niet altijd worden toegepast. Er zijn dus nog steeds patiënten onbehandelbaar. Er is dus nog verbetering van de ELANA techniek mogelijk. De toekomst van de ELANA techniek is vooral gericht op het creëren van een veiligere en makkelijkere manier om een anastomose te plaatsen. Tevens moet de techniek sneller zijn en de toepasbaarheid vergroot worden met ook geschiktheid voor andere gebieden (en daarmee grotere bloedvatdiameter range) in de hersenen.

Een van de ideeën om op een veiligere en makkelijkere manier een bypass te maken is de ELANA techniek te versimpelen, bijvoorbeeld door de hechtingen die in het hoofd worden geplaatst te vervangen door iets anders. Door deze manier van denken is de ELANA Clip ontstaan, dit is een ring met daaronder 2 pootjes. Deze pootjes worden in het ontvangende vat geschoven en vervangen dus de 8 zeer moeilijke microscopische hechtingen in het hoofd. De ELANA Clip is een vervanger van de ELANA ring. Om de ELANA Clip techniek meer toepasbaar te maken op meerdere vaten (met allen een verschillende diameter) in het hoofd, willen we uiteindelijk een device voor meerdere diameters bloedvaten in het hoofd ontwikkelen.

Om een duidelijker beeld te krijgen van de bestaande en de vernieuwde ELANA Clip techniek zie bijgevoegde bijlage.

Met de ELANA Clip techniek zijn er geen hechtingen nodig wat de aansluiting van het donorvat op het ontvangende vat een stuk makkelijker en veiliger maakt en minder (kostbare) tijd kost. Het device wordt afgeschaald (downsizen) waardoor er een grotere range aan diameters bloedvaten kan worden behandeld. Hierdoor zijn er meer patiënten te behandelen want de toepasbaarheid is groter.

In dit onderzoek zullen we ons aanvankelijk richten op de kleinere bloedvat diameterrange van 1.8mm tot 2.5mm, omdat dit aansluit op de huidige afmeting.

Het maken van een bypass op deze kleinere diameter vaten wordt gecompliceerd doordat een verkleining van het dwarsdoorsnede oppervlakte in een vat tot gevolg heeft dat de doorstromingssnelheid (flow) door het vat lager wordt. Bij een lagere flow kan gemakkelijker een bloedpropje ontstaan (met occlusie van de bypass tot gevolg). Om deze reden is er speciaal voor dit kleinere kaliber bloedvatdiameter een ovale Clip en laser Catheter ontwikkeld (in plaats van de ronde catheter). De nieuwe ovale vorm (ten opzichte van de eerdere ronde vorm) zorgt voor een vergroting van het dwarsdoorsnede oppervlakte van de anastomose. Door deze vernieuwing is het mogelijk om met de ELANA techniek ook een anastomose voor kleinere bloedvaten te creëren waarbij het oppervlak van (en daarmee de flow door) de anastomose gelijk blijft aan dat van de in de kliniek succesvolle grotere, ronde bypass. Deze speciaal ontwikkelde ovale Clip en laser Catheter zijn eerder al uitvoerig getest in een in vitro en ex vivo model en een acuut-dier model in konijnen op werkzaamheid en uitvoerbaarheid.

In de aan deze studie voorafgaande 'acute termijn' studie in konijnen onderzoeken we de hele reeks van Clip devices per bloedvatdiameter range, waarbij als eerste gestart is met de op de huidige techniek aansluitende bloedvat diameter range van ██████████. Om dit nieuwe Clip device echter toepasbaar te maken voor de kliniek en op de markt te kunnen brengen, is het noodzakelijk eerst een dierenstudie naar de lange termijn effecten (in een met humaan overeenkomstig vasculair systeem) uit te voeren. In dit onderzoek zullen we ons dan ook richten op het nieuwe ovale Clip device geschikt voor kleinere bloedvat diameters van ██████████. De acute termijnstudie zal 3 maanden voor de lange termijnstudie afgerond worden zodat de resultaten alvorens start aan de lange termijnstudie bekend en verwerkt zullen zijn.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit onderzoek is om patiënten met een afwijking in de bloedvaten in de hersenen, waarvoor geen behandelingsmethode beschikbaar is te kunnen behandelen. Dit willen we doen door de huidige ELANA techniek te verbeteren en toepasbaar te maken op bloedvaten met verschillende diameter in het hoofd. Deze studie, gericht op de toepassing voor de kleinere bloedvaten in de hersenen, zal antwoord geven op de volgende vragen:

- Blijft de anastomose open (patency)?
- Wat is de flow in de bypass, en het verloop hiervan op de langere termijn?
- Wat zijn de lange termijn effecten van bloed op het nieuwe ELANA Clip device?
- Hoe herstelt de bloedvatwand/ treedt er endotheel herstel op, en zo ja na hoeveel tijd?
- Prikt het clipje het bloedvat goed aan?
- Sluiten het device en bloedvat goed op elkaar aan?
- Kwaliteit en aspect bloedvatwand flapje
- Lekkage peroperatief?
- Zal het nieuwe ELANA device ook op de lange termijn lek vrij zijn en hoe ziet de gemaakte opening er op lange termijn eruit?

Aanwijzingen voor lekkage op de langere termijn zijn of er bloed tussen het device en het bloedvat zit (indien ja: hoeveel bloed, en tussen clip en bloedvat en/of catheter en bloedvat). De kans dat de studie binnen het aangegeven tijdsplan slaagt, is groot aangezien we bij de ontwikkeling en het uitvoeren van de testen niet afhankelijk zijn van externe partijen.

Dit project wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep die zelf ook de ELANA techniek (mede) heeft ontwikkeld. De techniek en de gehele operatie (inclusief de beste benadering van de vaten met intact houden van spieren en pezen) zijn vervolgens geoefend op kadaver varkens en een humaan kadavermodel om het gebruik van proefdieren te minimaliseren. Op deze manier is de learning curve doorlopen en hebben wij een bewezen werkend model opgesteld dat het mogelijk maakt een (technisch gemakkelijker uitvoerbare) slagaderlijke omleiding te maken, die ook geschikt is voor de kleinere bloedvaten in het brein.

Door de door onze onderzoeksgroep ontwikkelde in vitro, ex vivo en in vivo modellen en de duizenden experimenten die we hiermee uitgevoerd hebben, beschikken we al over zeer uitgebreide ervaring met het uitvoeren van deze techniek voor start met deze lange termijn varkensstudie.

3.3 Belang

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

Het maatschappelijk belang is zeer groot omdat er patiënten die voorheen niet te behandelen waren nu wel een behandeling kunnen krijgen. Zoals in 3.1 te lezen is, is het sterftecijfer door (gebarsten) aneurysmata in de hersenen wereldwijd bijna een half miljoen per jaar. Door de techniek meer toepasbaar te maken op verschillende diameters bloedvaten kunnen er dus veel meer patiënten behandeld worden. Zodra er meer patiënten zijn waar een behandeling voor is, zullen er meer chirurgen zich deze techniek eigen willen maken. Wat een gunstig effect heeft op het sterftecijfer wereldwijd.

Het wetenschappelijk belang is zeer groot. Er zijn niet alleen vaatafwijkingen, zoals aneurysmata (verwijdingen) in het hoofd maar dit soort afwijkingen zijn op meerdere plaatsen in het lichaam te vinden. Zo zijn er vaker vaatafwijkingen op en rondom het hart en in de buikholte. Met de inzichten die wij krijgen door onderzoek te doen naar de verschillende diameters bloedvaten in het hoofd kunnen we andere disciplines ondersteunen met hun onderzoek. De resultaten zullen worden gedeeld en er zou een

samenwerking kunnen ontstaan met een andere afdeling dan de neurochirurgie.

In deze studie onderzoeken we de lange termijn effecten en daarmee de toepasbaarheid van het device en de hiermee gemaakte bypass in de kliniek. Hiervoor wordt onder meer de doorgankelijkheid (patency) van en de flow door de bypass geëvalueerd, alsook het herstel van de binnenwandbekleding (re-endothelialisatie) van het donorvat en het acceptierend bloedvat van de omleiding. Het wetenschappelijk belang van deze studie is groot omdat het nodig is alvorens de stap naar de kliniek te kunnen maken.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Dit project is in het kader van een groter ontwikkelingstraject, om het vernieuwde ELANA device toepasbaar te maken voor een grotere range aan bloedvatdiameters dan de huidige techniek. Dit vernieuwde ELANA device met de ELANA Clip techniek vereist geen hechtingen, wat de aansluiting van het donorvat op het ontvangende vat technisch een stuk makkelijker en sneller uitvoerbaar maakt (met minder risico's tot gevolg).

In dit onderzoek richten we ons op de bloedvatdiameter met een range van [REDACTED] aangezien deze qua maatvoering aansluit op de al bestaande en in de kliniek gebruikte ELANA hechttechniek. De hiervoor ontwikkelde ovale vorm, ten opzichte van een ronde vorm, zorgt voor een vergroting van het dwarsdoorsnede oppervlakte van de anastomose. Door deze vernieuwing is het mogelijk om een anastomose voor kleinere bloedvaten te creëren waarbij het oppervlak van (en daarmee de flow door) de anastomose gelijk blijft aan dat van de in de kliniek succesvolle grotere, ronde bypass.

Voorafgaand aan deze lange termijnstudie is de nieuwe ovale ELANA Clip techniek al zeer uitgebreid in vitro, ex vivo en in vivo experimenten uitgevoerd om de toepasbaarheid te testen en ter optimalisatie van de techniek.

De ELANA Clip techniek bestaat uit 3 onderdelen, de Clip, de Laser Catheter en een manier om de clip en de catheter tijdelijk aan elkaar te bevestigen. Deze onderdelen worden elk afzonderlijk uitvoerig getest m.b.v. in vitro en ex vivo experimenten. Om de techniek en het device te optimaliseren worden verschillende configuraties van de catheter met elkaar vergeleken. Vervolgens worden de beste catheters verder met elkaar vergeleken. Dit komt neer op meer dan 700 experimenten.

Daarna wordt er in het lab een combinatie van de 3 onderdelen samen getest. Per groep gaat dit om honderden experimenten. De combinatie, het device, wordt uitvoerig getest op verschillende eigenschappen, zoals de verhouding bloedvat en device, lekkage van het device, lekkage van de anastomose en hoe ziet de opening eruit (rafelig, glad, open, dicht). Er wordt op het ontvangende vat een opening gelaserd. Er wordt gecontroleerd of het flapje (rondje van de bloedvatwand wat eruit gelaserd is) helemaal los is of nog voor een gedeelte vast is en hoe dit zogenoemde flapje eruit ziet. In de ex vivo experimenten wordt het device, de 3 onderdelen, getest op konijnenvaten die gehaald zijn in een consumptieslachterij. In de testopstelling staat op deze bloedvaten een standaard druk van 100 mmHg. Deze druk is vergelijkbaar met de druk in het hoofd, echter simuleren we dit met water. Tijdens de ex vivo experimenten kunnen we alle facetten van het device al testen, alleen niet hoe het device zich verhoudt in combinatie met bloed en de werkzaamheid in een levend model. Het gaat om hele kleine onderdeeltjes waar bloed in/tussen kan gaan zitten en de techniek toepassen in een levend dier is anders dan op een statisch model. Dit kan een dusdanig ander resultaat geven dat er een verificatie met bloed nodig is.

Hiervoor zijn in vivo experimenten noodzakelijk om te kijken hoe het product zich op levend weefsel ontwikkelt. Het effect van het omringende milieu en omstandigheden in het lichaam, met bloed door de vaten met wisselende bloeddruk en flow, kan niet worden onderzocht in een in vitro opstelling. De stap van in vitro en ex vivo naar de kliniek (patiënten) zal anders te groot zijn.

Het in vivo gedeelte bestaat uit twee onderdelen: een acuut termijn model en een lange termijn studie. Voorafgaand aan deze lange termijn studie is in een acute termijn konijnenstudie de directe werkzaamheid van ons device in een levend proefdiermodel geanalyseerd. Alvorens de stap naar de kliniek (patiënten) mogelijk is, moet echter ook de werkzaamheid en de mogelijke effecten van het

device op de langere termijn worden geverifieerd.

Dit tweede in vivo gedeelte van het onderzoeksproject bestaat uit een studie om de doorgankelijkheid (patency) en werkzaamheid (geen lekkage, flow door de omleiding) van de omleidingen op de langere termijn te verifiëren. Hiervoor zal de speciaal ontwikkelde ovale ELANA Clip techniek voor bloedvaten in de afmetingsrange van [REDACTED] getest worden.

Uit uitgebreid ex vivo onderzoek is gebleken dat de [REDACTED] in de [REDACTED] n van het varken [REDACTED] een geschikte afmeting hebben. Er kan [REDACTED] één bypass gemaakt worden. Als donorvat zal de [REDACTED] gebruikt worden. Derhalve kunnen er per varken [REDACTED] bypasses en dus [REDACTED] anastomoses/verbindingen) worden gemaakt: in de [REDACTED] en [REDACTED]

[REDACTED] De conventionele handgehechte anastomose fungeert nog steeds als gouden standaard in de kliniek en vormt daarmee de ultieme controlegroep. De toevoeging van een dergelijke controlegroep maakt een goede evaluatie van de toepasbaarheid van het device in de kliniek, ten opzichte van de huidige gouden standaard mogelijk.

Het in vivo experiment zal starten met een pilot van [REDACTED] varkens met een overleving van 10 dagen. Hierna zal aan de hand van de resultaten en mogelijke complicaties volgens het 'go or no-go' principe worden bepaald of de rest van de experimenten zal worden uitgevoerd. Indien er complicaties, zoals wondgenezingsproblemen, optreden bij de varkens zal in overleg met de GDL dierenarts besloten wat de te nemen maatregelen moeten zijn.

De experimenten bestaan in totaal uit [REDACTED] varkens. Deze worden onderverdeeld in [REDACTED] subgroepen van elk [REDACTED] varkens met een levensduur van [REDACTED] respectievelijk. Dit is inclusief de eerste drie varkens.

Elk varken ontvangt twee bypasses: [REDACTED] (één bypass met ons ontwikkeld device en één handgehechte bypass (controle)).

De overlevingstijden zijn gekozen om de doorgankelijkheid (patency) van de anastomoses en het verloop van het herstel van de binnenwand bekleding (re-endothelialisatie) over de tijd te kunnen bekijken. Aangezien enerzijds een angiogram de gouden standaard is en de enige techniek om de doorgankelijkheid van het bloedvat te quantificeren (in percentage te kunnen uitdrukken), maar we anderzijds de dieren minimaal ongerief willen aandoen, is ervoor gekozen het uitvoeren van een angiogram tot het absolute minimum te beperken. Met behulp van een angiogram is de doorgankelijkheid dus percentueel meetbaar wat vergelijking over de tijd en tussen de dieren mogelijk maakt. Een echo-doppler geeft enkel aan of er wel of geen bloed door de bypass stroomt, waarbij vergelijking en analyse over de tijd dus niet mogelijk zijn.

Tijdens het experiment zal er per varken postoperatief bij 3 weken een angiogram worden uitgevoerd. Indien de anastomose dicht zit/ niet meer doorgankelijk is, zal het dier vroegtijdig getermineerd worden en de vaten verder onderzocht worden.

Daarnaast wordt er op het vooraf bepaald interval op week 1 en week 6 na de operatie onder een roesje met behulp van een niet-invasieve echo-doppler de doorgankelijkheid van de anastomoses in de voorpoten gecontroleerd. Hiermee wordt een indruk verkregen van het wel of niet doorgankelijk zijn van de anastomose. De echo-doppler onder een roesje wordt gecombineerd met bloedafname om verschillende parameters te controleren. Deze bloedafname op een aantal vaste tijdstippen in de overleving zijn ook erg belangrijk in de acceptatie van gebruikers en de beoordelende instanties Conformité Européenne (CE)/ Food and Drug Administration (FDA).

Als de overlevingstijd erop zit, zal er vlak voor terminatie bij de dieren van alle overlevingsgroepen onder anesthesie nogmaals een angiogram worden uitgevoerd ter controle en vergelijk met de angiogram op 3 weken.

Vervolgens wordt het varken geëuthanaseerd met een overdosis euthasaat en worden de bypasses [REDACTED] verwijderd voor histologisch onderzoek. De bloedvaten zullen hierbij ook onder een elektronen microscoop bekeken worden om iets te kunnen zeggen over het herstel van de binnenwandbekleding (re-

endothelialisatie) op de langere termijn.

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

Er wordt 1 soort proefdier gebruikt, het vrouwelijke Dutch Landrace varken (big) van 25-30 kg. Uit [REDACTED] wordt een vene gehaald, die vervolgens als donorvat wordt gebruikt om in beide voorpoten een bypass te maken; één middels de ovale ELANA clip techniek en één middels de conventionele handtechniek. Voor de studie worden in totaal [REDACTED] varkens gebruikt. Er zijn drie overlevingsgroepen elk bestaande uit [REDACTED] varkens: [REDACTED]

De 9 varkens ondergaan de volgende operaties:

- Een laterale incisie in [REDACTED], waarna vrijprepareren en oogsten van de [REDACTED] waarna de incisie na hemostase gesloten wordt.
 - Een mediale incisie in de [REDACTED], vrijleggen van de [REDACTED], bypass aanleggen met behulp van het ELANA device en het verkregen donorvat, sluiten van de wond.
 - Een mediale incisie in de rechter voorpoot, vrijleggen van de arterie brachialis, hangehechte bypass aanleggen met het donorvat, sluiten van de wond (controle).
- Peroperatief zal een angiogram worden uitgevoerd om de doorgankelijkheid van de bypasses te evalueren.

Tijdens de follow-up wordt op week 1 en week 6 de doorgankelijkheid van de omleiding gecontroleerd met een niet-invasieve echo-doppler. Gezien de bewegelijkheid van de varkens zal dit onder een roesje plaats vinden. Dit zal gecombineerd worden met bloedafname. De bloedafname is nodig ter controle van het effect van het metalen clipje op het lichaam en samenstelling in het bloed.

Tevens zal voor de langere overlevingsgroepen varkens bij 3 weken nog eenmalig een angiogram plaatsvinden onder anesthesie door de GDL.

Vlak voor terminatie zal bij alle overlevingsgroepen een laatste angiogram plaatsvinden. Een angiogram is de gouden standaard bij onderzoek van vaatdoorgankelijkheid en maakt kwantitatieve analyse van de bloeddorstrooming (flow) mogelijk.

Met behulp van een angiogram is de doorgankelijkheid dus percentueel meetbaar en zowel onderling als over de tijd te vergelijken. Een echo-doppler geeft enkel aan of er nog bloed door het vat stroomt, waarbij vergelijking en analyse van geleidelijke veranderingen over de tijd dus niet mogelijk zijn.

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 is vanuit de kliniek gewenst om een zo breed mogelijk spectrum aan diameter bloedvaten te kunnen behandelen met een bypass. In deze studie richten we ons op de nieuw ontwikkelde device voor kleinere bloedvaten in de hersenen van [REDACTED].

Hoe groter de opening van de anastomose is, hoe groter de kans is dat deze open blijft. Het open blijven van de anastomose, het lekvrij zijn en hoe de opening eruit ziet, worden al uitgebreid getest tijdens de ex vivo experimenten en voor deze in vivo experimenten zal het go/no go moment met betrekking tot het functioneren van het device al bij de ex vivo experimenten zijn. Tevens is er nog een go/ no go moment ingebouwd in de studie. De resultaten in de [REDACTED], respectievelijk [REDACTED] overlevingsgroepen zijn bepalend of en zo ja op welke wijze de experimenten worden voortgezet. Indien er sprake blijkt van wondgenezingsproblemen of circulatieproblemen [REDACTED] zal hier eerst een passend alternatief voor gevonden moeten worden in overleg met het GDL en de dierenarts alvorens gecontinueerd zal worden met de studie.

De acute-termijn in vivo experimenten in konijnen zullen als verificatie functioneren van de ex vivo experimenten, waarbij de techniek in combinatie met bloed bekeken wordt. Hierna worden in deze studie ook de effecten en werkzaamheid op langere termijn bekeken.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Dutch landrace – varken, Lange termijn onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor bloedvaten van 1.8 tot 2.5 mm
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.	11500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC 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	Dutch Landrace –varken, Lange termijn onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor bloedvaten van 1.8 tot 2.5 mm

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit project vormt een belangrijk onderdeel van ons onderzoek naar de ontwikkeling van een simpelere, veiligere en makkelijkere versie van de huidige ELANA techniek. De ELANA techniek is een techniek die speciaal ontwikkeld is voor afwijkingen van de bloedvaten in het hoofd.

Om de bestaande techniek te versimpelen en sneller te maken en de toepasbaarheid van de techniek te vergroten is het device verder ontwikkeld. Zo is ook de ELANA clip techniek ontwikkeld, die de ELANA ring en de microscopische hechtingen vervangt. Om de ELANA Clip techniek toepasbaar te maken op een grotere bloedvatdiameter range is het nodig om een device voor meerdere diameters bloedvaten in het hoofd te ontwikkelen.

Om niet voor elke diameter bloedvat een apart device te maken, willen we devices ontwikkelen die te gebruiken zijn in bloedvaten die binnen een range vallen. In dit onderzoek zullen we ons richten op de bloedvat range van [REDACTED] omdat deze qua maatvoering aansluit op de al bestaande Elana hechttechniek.

Het in vivo gedeelte bestaat uit twee onderdelen. Eerst is in een acuut dierenmodel in konijnen de technische uitvoerbaarheid van het nieuwe device getest, waarbij vooral gekeken wordt naar het mogelijk lekken van de anastomose en de kwaliteit van de opening in het ontvangende vat.

Alvorens deze techniek in de kliniek te kunnen toepassen hebben wij een groot diermodel nodig om de lange termijn effecten, de genezigstendens en kwaliteit van de techniek in het levende organisme te testen op een met de mens vergelijkbaar vasculair systeem. Het experiment is opgebouwd uit een studie van [REDACTED] dieren, waarin in elk dier een bypass met het device gemaakt wordt [REDACTED] en een controle

conventionele handgehechte bypass [REDACTED]. Gebaseerd op onze uitgebreide ervaring is gekozen voor een varkensmodel. Omdat het onderzoek naar dit nieuwe device en de locatie van het accepterende vat [REDACTED] niet eerder is uitgevoerd, worden eerst [REDACTED] varkens geopereerd. Aangezien complicaties gebonden aan de operatie en wondgenezingsproblemen vaak binnen de eerste week zichtbaar worden, is besloten voor deze 'pilot' de [REDACTED] varkens in de overlevingsgroep van [REDACTED] te evalueren. Na afloop van de [REDACTED], ten tijde van terminatie van deze [REDACTED] experimenten zal er een go/ no go besluit plaatsvinden. De beslissing voor 'go or no go' zal gemaakt worden in overleg met de dierenarts en de IvD. Belangrijke criteria waar bij deze afweging op gelet wordt, zijn de wondgenezing [REDACTED], en eventuele hinder van de operatiewond [REDACTED] evidente lekkage van het device, de vitaliteit en doorbloeding van [REDACTED] (met behulp van echo-doppler op week 1), en het optreden van wondinfectie. Indien de wond infecteert of slecht geneest door tractie op de wond moet bij de volgende dieren de anastomoses meer distaal [REDACTED] worden aangelegd. Ook bij onvoorziene andere aan de operatie gerelateerde complicaties wordt er na de [REDACTED] varkens niet verder gegaan met het dieronderzoek. Na uitvoerig onderzoek over de oorzaak van de behaalde resultaten zal er een verbeterplan worden opgesteld. Standaard welzijnslogboek wordt ingevuld voor de volgende parameters: temperatuur, gewicht, hartslag, wondinspectie, ademhaling, voedselinname en mobiliteit. Om de doorgankelijkheid van de bypass te testen wordt op postoperatief op week 1 en week 6 onder een roesje een niet-invasieve echo-doppler van de [REDACTED] verricht. Ter vermindering van ongerief aan het dier wordt er gelijktijdig bloed afgenomen voor onderzoek (controle op ontstekingswaarden).

De primaire uitkomstparameters van deze lange termijnstudie zijn:

- Doorgankelijkheid van de anastomose op langere termijn (tot [REDACTED] maanden).
- Flow door de bypass (quantificeerbaar met angiogram peroperatief, op week 3 en bij terminatie en vergelijking schatting/ indicatie over doorgankelijkheid verkregen met echo-doppler direct peroperatief en postoperatief op vier meetmomenten; week 1, week 3, week 6, en bij terminatie.)
- Langdurige re-endothelialisatie (herstel binnenwand bekleding bloedvat) van de anastomose
- Prikt het clipje het bloedvat goed aan
- Sluiten het device en bloedvat goed op elkaar aan
- Kwaliteit bloedvatwand flapje
- Lekkage peroperatief?
- Aanwijzingen voor lekkage op langere termijn: zit er bloed tussen het device en het bloedvat (zoja hoeveel bloed, en tussen clip en bloedvat en/of catheter en bloedvat).

Alle bovengenoemde parameters worden zover mogelijk eerst in de in vitro en ex vivo experimenten uitvoerig getest. Voor de werking van het device op langere termijn en de bloedvatwand genezing is echter een levend dier nodig.

Deze lange termijn studie is geslaagd als er uit de resultaten blijkt dat de anastomosen bij follow-up een gelijkwaardige of betere doorgankelijk (patency) tonen dan de controle handgehechte bypass en de door ons in eerder onderzoek aangetoonde patency van de ELANA techniek.

Ook wordt de flow over de bypass op de lange termijn geëvalueerd. Tevens wordt er op 3 eindpunten (10 [REDACTED] gekeken naar het herstel (re-endothelialisatie patroon) van de binnenbekleding van de bloedvatwand. Bij eerdere studies van de ELANA techniek in varkens trad volledig herstel van de bloedvatwand altijd binnen 3 weken op. In deze studie wordt geëvalueerd of het herstel van de bloedvatwand voor het nieuwe device gelijk is.

Ook wordt in deze in vivo studie nogmaals de kwaliteit van de gemaakte opening in het ontvangende vat en de aansluiting van het device op het bloedvat (lekkage) geëvalueerd in een diermodel met een bloedvatwanddikte gelijkend op dat van de mens.

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 experiment is opgebouwd uit een studie van [] varkens.

1. Het varken wordt onder anesthesie gebracht.
2. De [] worden voor benadering van respectievelijk de [] (ontvangend vat) en [] (donorvat) opengelegd.
3. Het donorvat [] in [] wordt vrijgeprepareerd en geogst als donorvat.
4. In [] wordt een bypass aangelegd op []; links een ELANA Clip bypass, rechts een handgehechte bypass (controle).
5. De 2 ovale sutureless Elana Clips worden in het ontvangende vat geschoven en de opening wordt gemaakt. De beide anastomoses worden end tot end aan elkaar gemaakt.
6. Na het plaatsen van de 2 bypasses (en dus 4 anastomoses) wordt de flow door de bypass gemeten met een angiogram.
7. Hierna wordt de subcutis en opperhuid gesloten
8. Het dier wordt op OK wakker gemaakt en als er geen respiratoire stress is, wordt het dier in een verblijf gelegd.
Indien er sprake is van respiratoire stress zal het dier langer op de OK verblijven totdat de vitale parameters (saturatie, CO₂, bloeddruk) gestabiliseerd zijn en het dier naar een verblijf kan worden overgeplaatst.
9. Overlevingstijd verschilt per dier ([]).
10. Bij de [] lange termijn varkens wordt op week 3 onder narcose een angiogram uitgevoerd.
11. Op week 1 en 6 worden onder een roesje met een niet-invasieve echo-doppler de doorgankelijkheid (patency) van beide anastomoses in de voorpoten beoordeeld. Gelijkzeitig zal er bloed worden afgenomen om de belasting voor het dier te beperken.
12. Voor terminatie wordt het dier opnieuw onder anesthesie gebracht.
13. Er wordt vlak voor terminatie een angiogram van beide bypasses verricht.
14. Het dier wordt op OK van het GDL getermineerd. De [] worden verwijderd voor histologisch onderzoek.

Behoudens stap 11 die in week 1 en week 6 wordt uitgevoerd, wordt elke stap eenmalig uitgevoerd. De duur van de operatie (inclusief 1 uur voorbereiding met anesthesie) wordt geschat op 5 uur, de duur van de angiogram 1,5 uur en de duur van de terminatie 2 uur.

Indien de angiogram bij week 3 afwijkend is en/of de echo-doppler bij 6 weken een dubieus resultaat oplevert over de doorgankelijkheid van de anastomose, wordt er bij 6 weken alsnog een angiogram uitgevoerd.

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

Gezien de grote eerdere ervaring met ELANA techniek op varkens is een beperkt aantal proefdieren nodig om de lange termijn resultaten van het verbeterde device te verifiëren.

Eerder onderzoek van de ELANA techniek op high-flow vaten in 28 varkens (28 bypasses, 56 anastomoses waarvan de helft met behulp van de ELANA techniek en helft controle groep) met 4 overlevingsgroepen toonden een patency van 86% aan op 6 maanden en een volledige re-endothelialisatie na 2 weken (*Bron Long-term reendothelialization of excimer laser-assisted nonocclusive anastomoses compared with conventionally sutured anastomoses in pigs; Streefkerk HJ et al; J Neurosurg. 2005 Aug;103(2):328-36*).

Hierop volgend onderzoek naar de sutureless Clip techniek (SELANA) in high flow vaten in 38 varkens (38 bypasses, 76 anastomosis, allen SELANA) liet een patency van 87%, waarbij alle occlusies binnen de eerste 3 weken optraden. Tussen de twee lange termijn overlevingsgroepen van 3 maanden en 6 maanden werden geen verschillen gezien. (*Bron: Patency, flow, and endothelialization of the sutureless Excimer Laser Assisted Non-occlusive Anastomosis (ELANA) technique in a pig model; van Doormaal TP et al.; J Neurosurg. 2011 Dec;115(6):1221-30. doi: 10.3171/2011.6.JNS101491*). Doordat occlusie van de bypasses altijd voor 3 weken optreedt en er geen veranderingen in doorgankelijkheid optreden na 3 maanden is

besloten de maximale overlevingsgroep op 3 maanden te stellen.

Tevens werd bij dit onderzoek bij alle dieren een volledige re-endothelialisatie bij 3 weken gevonden (gelijk aan het histologisch beeld bij 3 en 6 maanden). Deze studies zijn uitgevoerd bij bloedvatdiameters van 2.6 tot 3.0mm.

Tevens zijn er ook meerdere lange termijn data beschikbaar (totaal 79 varkens) naar een ontwikkelde ELANA techniek toepasbaar voor kleinere en zogenoemde Low-flow coronaire bloedvaten met overeenkomstige resultaten in patency en re-endothelialisatie. In de laatste studie met 58 varkens wordt hierbij ook gebruik gemaakt van een ovale clip device om te compenseren voor een afname in bloedvatdiameter. Door deze aanpassing kan in deze studie de flow en daarmee de doorgankelijkheid door de bypass gewaarborgd worden (93%) ondanks de kleinere bloedvat- en anastomose diameter (1.4-1.6mm) en de low flow karakteristieken van deze bloedvaten (*Bron: D. Stecher (2015), Laser-assisted coronary anastomotic connector: a journey into the development and preclinical evaluation, PhD thesis (Trinity Clip), Utrecht*).

In de huidige studie willen we de lange termijn effecten beoordelen van een verder ontwikkelde ovale Clip device voor bloedvaten in de hersenen met een diameter van [REDACTED]. Deze vaten vallen qua flow/ bloedstroomsnelheid karakteristieken tussen de eerder onderzochte 'grotere' high-flow bloedvaten in de hersenen en de low-flow coronaire bloedvaten, en kunnen beschouwd worden als 'medium flow' bloedvaten. Zowel de afmeting van de bloedvaten ([REDACTED] i.p.v. 1.4-1.6mm) alsook de flow karakteristieken ('medium flow' i.p.v. low-flow) in dit huidige onderzoek zijn gunstiger voor de patency van de bypass dan in de studie van Stecher et al (*Bron: D. Stecher (2015), Laser-assisted coronary anastomotic connector: a journey into the development and preclinical evaluation, PhD thesis (Trinity Clip), Utrecht*).

Aan de hand van bovenstaande resultaten uit onze eerdere onderzoeken kunnen we het aantal benodigde dieren voor deze studie naar de lange termijn effecten en toepasbaarheid van ons ontwikkeld device tot een minimum beperken.

Aan de hand van de statistische non-inferiority sample size calculation bij een aangenomen patency van 93% in de experimentele groep (zie hierboven vermelde data D. Stecher), met alpha van 0.05, power (beta) van 0.80 en een non-inferiority limit van 10% komt je uit op een sample size van 26 dieren per groep. Aangezien we binnen elk varken zowel een experimentele als ook een controle bypass maken, zou dit ook in totaal neerkomen op 26 varkens.

Aangezien de uitgebreide beschikbare eerdere data van de ELANA techniek op de lange termijn zijn de volgens de non-inferiority test berekende 26 dieren niet nodig. Om deze reden willen wij de lange termijn studie uitvoeren met [REDACTED] varkens (wat neerkomt op [REDACTED] bypasses en [REDACTED] anastomoses, waarvan [REDACTED] SELANA Clip bypasses en dus [REDACTED] SELANA anastomoses).

Gezien de uitgebreide beschikbare data over de lange termijn effecten van de eerdere ELANA technieken (zie hierboven) zullen de [REDACTED] varkens voldoende zijn om de verificatie van dit device aan te kunnen tonen. Afhankelijk van deze resultaten zal verder onderzoek naar de toepasbaarheid van dit device in de kliniek plaats vinden.

Om onvoorziene zaken uit te sluiten willen we [REDACTED] reserve dieren aanvragen. Deze zullen alleen gebruikt worden indien er een varken zal worden uitgesloten van de studie. In totaal worden dus [REDACTED] varkens aangevraagd.

B. De dieren

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

Female Dutch Landrace pigs biggen van 25-30 kg afkomstig van een varkensfokkerij in Nederland. Het varken heeft een vasculair systeem lijkend op dat van de mens. Voor deze studie zullen 9 varkens worden gebruikt.

Voor deze studie zijn er [REDACTED] varkens nodig en vragen we [REDACTED] reserve dieren aan indien er onverhoopt een varken uitgesloten moet worden van de studie. In totaal vragen we dus [REDACTED] varkens aan.

Voor deze studie zijn er 3 tijdsgroepen: [REDACTED], waarbij elke tijdsgroep [REDACTED] varkens bevat. Daarnaast willen we [REDACTED] varkens extra aanvragen indien er iets gebeurt waarvoor we een dier moeten excluderen.

Er is gekozen voor vrouwtjes omdat die makkelijker samen te huisvesten zijn. De varkens worden geopereerd bij een gewicht van 25-30kg. Dit komt overeen met het gewicht van de slachthuisvarkens (voor

het ex vivo deel) waarvan de [REDACTED] de benodigde diameter heeft van [REDACTED]; overeenkomend met de bloedvatgrootte waarvoor dit device ontwikkeld is.

Uiterlijk twee weken voor start van de procedure worden de varkens besteld, zodat er voldoende tijd is voor acclimatisatie.

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.

Bij de in vitro opstellingen is sterk gelet op de vervanging, vermindering en verfijning.

De verschillende onderdelen van de ELANA clip techniek worden afzonderlijk uitvoerig getest met meer dan 700 ex vivo experimenten (600 + 3x60, zie eerdere toelichting). Vervolgens worden verschillende onderdelen, het device, samen gevoegd met nogmaals zo'n 240 ex vivo experimenten. Dit brengt een totaal van ruim 1000 experimenten die worden uitgevoerd met een in vitro opstelling. Er is in totaal dus een hele grote vermindering van het aantal dieren dat nodig is.

De in vitro experimenten worden uitgevoerd op konijnen aorta's die we verkrijgen uit een consumptie slachthuis. We kunnen de situatie op deze manier nabootsen door water onder druk door het bloedvat te laten stromen in plaats van bloed in het konijn. Dit levert ons al heel veel resultaten op en aan de hand van deze bevindingen kunnen we de devices verder optimaliseren. Echter is de overgang van in vitro opstelling naar de mens te groot. Om de overgang te verkleinen is in een acuut-diermodel een verificatie van de veiligheid en kwaliteit van het device in een levend dier uitgevoerd. Daarnaast is een lange termijn studie naar de effecten en werkzaamheid in een groot diermodel met een vasculair systeem lijkend op dat van de mens cruciaal. Deze tussenstap is nodig om de vertaalslag te kunnen maken naar de mens en het product op de markt te kunnen brengen.

Tijdens de in vivo studie is er ook rekening gehouden met vermindering, daarom worden er per varken [REDACTED] bypasses gemaakt ([REDACTED]). Dit houdt in per varken [REDACTED] anastomoses (verbindingen): twee met behulp van de nieuwe ELANA Clip techniek en twee conventionele handgehechte anastomoses.

Tevens kan als gevolg van onze opgedane ervaringen in de voorgaande in vitro, ex vivo en in vivo experimenten (zoals hierboven ook vermeld bij vervanging) het aantal dieren in dit experiment beperkt blijven.

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 ter acclimatisatie een week voor de procedure in groepen gehuisvest bij de GDL. De dieren krijgen tijdens de gehele procedure anesthesie.

De pijnstilling begint op dag -1 en zal postoperatieve gedurende 5 dagen worden toegepast.

Antibiotica zal preoperatief en de twee daaropvolgende dagen gegeven worden.

De dieren zullen postoperatief individueel gehuisvest worden tot 1 week na de operatie. Daarna zullen we de dieren in groepen huisvesten in grote verblijven met speeltjes.

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.

We zijn het enige onderzoekscentrum in de wereld dat onderzoek doet naar de Elana techniek. Hierdoor weten we zeker dat de experimenten nog niet eerder zijn uitgevoerd. Deze patiëntengroep valt in een niche markt, waardoor er weinig tot geen onderzoek wordt gedaan naar alternatieve behandelmethoden.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De dieren worden postoperatief tijdelijk (gedurende 1 week) individueel gehuisvest. Bij huisvesting in groepen kunnen varkens aan elkaars littekenwond gaan zitten en goede wondsluiting voorkomen. Na een week is de wond bijna helemaal genezen en is het risico zeer klein dat de verdere wondgenezing negatief beïnvloed wordt door huisvesting in groepen. Vanaf dit moment beoordelen we het voordeel van groepshuisvesting dus groter dan het risico op extra ongerief hierdoor.

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.

Er wordt pijnverlichtingsmedicatie toegepast tijdens de inleiding en algehele anesthesie en de peroperatieve periode (van dag -1 tot en met dag 5). Dit wordt gedaan met een butranpleister op de huid

Tijdens de niet invasieve echo-doppler meting van de anastomose en [REDACTED] wordt een roesje gegeven, zodat het onderzoek [REDACTED] goed kan worden uitgevoerd. Dit zal in totaal

per varken een half uur duren. Tijdens dit roesje zal ook bloed worden afgenomen zodat het ongerief tot een minimum beperkt wordt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Er kan ongerief plaatsvinden doordat er bij [] weken een angiogram plaats moet vinden om de doorgankelijkheid van de bypass te evalueren. Dit zal onder anesthesie en pijnstilling volgens protocol plaatsvinden. Ook zullen er op twee meetmomenten bloedmonsters (onder een roesje, gecombineerd met de niet-invasieve echo doppler) moeten worden afgenomen en de wond zal moeten worden geïnspecteerd.
2. Voor aanvang van het experiment zitten de varkens in groepsverband. Het zou kunnen dat de dieren pre-operatief ook korte tijd individueel gehuisvest worden. Dit zou een kleine vorm van ongerief kunnen veroorzaken.
3. Circulatieproblemen [] (waarvoor o.a. eerst de pilot met [] dieren wordt gedaan) met als gevolg oedeem, slechte mobiliteit/ immobiliteit en/of zelfs necrose.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Een oorzaak van deze verschijnselen zullen allen te wijten zijn aan de operatie.
2. De oorzaak voor het solitair huisvesten kan vanwege vechten of indien het varken in groepsverband niet getolereerd wordt of omdat het het laatste varken is van de overlevingsgroep.
3. Deze worden veroorzaakt door de operatie waarbij een (afvoerend) [] als donorvat wordt gebruikt voor de bypass/ omleiding [].
(Indien dit optreedt tijdens de pilot studie zal er in overleg met de dierenarts en de IvD een alternatieve lokatie voor een donorvat als oplossing gevonden worden alvorens doorgedaan zal worden met de rest van de studie.)

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

De operaties worden uitgevoerd door zeer bekwame chirurgen die veel ervaring hebben met de ELANA techniek. Tevens wordt er met de planning rekening mee gehouden dat de dieren, indien het niet anders kan, zo kort mogelijk alleen gehuisvest zullen 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.

Humane eindpunten worden bereikt bij het optreden van ernstig ongerief (dus meer dan het cumulatief ongerief voor dit type dierproef) wordt een humaan eindpunt toegepast.

Ernstig ongerief treedt op bij:

- Vasculaire complicaties (trombose met doorbloedingsproblemen en/of necrose) poot: diagnose wordt in de stal gesteld waarna overleg met de dierenarts.
- Bij postoperatieve ontsteking/ infectie/ temperatuurstijging: intercurrente infectie in overleg met dierenarts aangepaste antibiotica. Wanneer geen verbetering na 72uur of ondragelijk lijden in overleg met dierenarts.
- Ernstige wondinfectie operatielitteken
- Ernstig verminderde mobiliteit/ teruggetrokken sociaal gedrag
- Niet eten gedurende 48 uur
- Niet drinken gedurende 36 uur

- Lijden van het dier, dit ter beoordeling aan artikel 12 (dierverzorger), proefdierdeskundige en veterinaire GDL.

Bij het bereiken van een humaan eindpunt zal het dier onder anesthesie gebracht worden. Er zal eerst een angiogram van de gemaakte twee bypasses in de voorpoten gemaakt worden. Daarna zal het dier getermineerd worden volgens het normale protocol. Indien dit niet mogelijk zal direct worden overgegaan tot euthanasie m.b.v. euthanasaat.

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

Wij schatten in dat er mogelijk 1-2 dieren door perioperatieve complicaties kan overlijden die niet direct veroorzaakt zijn door de specifieke operatie, maar door de algemene narcose (bijv. intubatie of gevoeligheid voor bepaalde middelen). Derhalve vragen wij 2 extra dieren aan (dus ■■■ in totaal). Als er geen extra dieren nodig zijn zullen we deze ook niet bestellen.

K. Classificatie van ongerief

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

matig

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om een deel van de primaire eindpunten van deze studie te onderzoeken wordt na afloop van het experiment het ontvangende bloedvat met de daarop gemaakte anastomoses uitgehaald. Dit ontvangende vat wordt in het lab uitvoerig verder geanalyseerd op histologie.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.I.545.007
2. Titel van het project : Onderzoek naar de verbetering van de ELANA techniek voor bloedvaten van 1.8 tot 2.5 mm
3. Titel van de NTS : Onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor kleinere bloedvaten

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: 21-04-2017
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 03-05-2017
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 08-05-2017 / 15-05-2017
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 08-06-2017

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: 08-05-2017
- Datum antwoord: 15-05-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC zou U willen adviseren om eerder in de aanvraag te vermelden waarin de huidige aanvraag zich onderscheidt van de vorige aanvraag.
Dit is gewijzigd in het projectvoorstel.
 - 3.4 Onderzoeksstrategie: 3.4.4. : De DEC adviseert U om de titel van de bijlage zodanig te veranderen dat deze de lading dekt van het onderzoek.
De titel is gewijzigd.
- 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. Uitgangspunt van het onderzoek zijn de behandeling van Aneurysmata. Dit zijn uitstulpingen in de wand van een slagader en komen frequent voor. Wanneer een aneurysma scheurt ontstaat er een bloeding welke fataal kan zijn. De huidige behandelopties zijn clipping (aneurysma afsluiten), coiling (aneurysma opvullen met platina veertjes zodat het aneurysma afsterft) of het maken van een bypass. Clipping en coiling zijn echter niet mogelijk wanneer bijvoorbeeld het aneurysma te groot is, te diep is gelegen (bijvoorbeeld in de hersenen) of de hals van het aneurysma te breed is. Met een bypass zou het bloedvat tijdelijk moeten worden afgesloten, wat een probleem is wanneer het aneurysma zich in de hersenen bevindt. De ELANA techniek, beschreven in het huidige projectaanvraag, is een bypass techniek waarbij het bloedvat niet afgesloten hoeft te worden. In deze techniek wordt gebruik gemaakt van een laser welke door het donorvat wordt geschoven en een opening maakt in het ontvangende bloedvat. Dit wordt aan beide kanten van het aneurysma gedaan, en vervolgens worden de twee donorvaten aan elkaar vastgemaakt en is de bypass compleet. De ELANA techniek, die reeds bij patiënten wordt toegepast, wordt door de onderzoeksgroep steeds verder geoptimaliseerd en breder toepasbaar gemaakt voor bloedvaten van verschillende diameters. In de huidige projectaanvraag willen de onderzoekers zich richten op de bloedvat diameterrange van █████ mm. Om de doorstromingssnelheid (flow) in smalle bloedvaten te

bevorderen is een ovale clip en laser ontwikkeld. Deze aanpassingen zijn getest in de voorafgaande 'acute termijn' studie in konijnen. Om het nieuwe clip device toepasbaar te maken voor de kliniek en op de markt te kunnen brengen, is het echter noodzakelijk om ook onderzoek te doen naar de lange termijn effecten in een met een humaan overeenkomstig vasculair systeem. Hiertoe willen de onderzoekers een bypass maken [REDACTED] van een varken met de ELANA techniek, en als controle een bypass maken [REDACTED] met de conventionele bypass techniek. De onderzoekers beogen de doorgankelijkheid, de werkzaamheid (geen lekkage, goede flow door de bypass) en het herstel van de binnenwand bekleding van de bypass te onderzoeken in drie experimentele groepen welke na [REDACTED] [REDACTED] worden geofferd. De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 1 uit de "Handreiking Invulling Definitie Project". De benodigde experimentele dierproeven zijn duidelijk en logisch beschreven in één bijlage. De DEC is er daarom van overtuigd dat het project toetsbaar is.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om te onderzoeken of de bypass welke is gemaakt door de ovale ELANA clip techniek op bloedvaten van diameterrange [REDACTED] ook op de lange termijn goed blijft functioneren. Het uiteindelijke doel van het project is om patiënten met een aneurysma in een bloedvat in de hersenen (of elders) te kunnen behandelen. Voordat een dergelijke (gewijzigde) behandelmethode in mensen toegepast kan worden is het van belang dat in dierexperimenten aannemelijk is gemaakt dat de techniek veilig is en goed werkt. 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 (toekomstige) patiënten, de proefdieren, de onderzoekers en het bedrijf ELANA. De eerste belanghebbenden zijn (toekomstige) patiënten. Zoals reeds genoemd bij C1, komen aneurysmata frequent voor en is er momenteel niet voor alle patiënten een behandeling mogelijk. Door de toepasbaarheid van de ELANA techniek te vergroten door middel van de ovale clip techniek en door positieve effecten op de lange termijn te kunnen waarborgen, kunnen meer patiënten worden behandeld. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en als gevolg van het experiment zullen de dieren stress en pijn ondervinden. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat het ontwikkelen van deze nieuwe techniek bijdraagt aan een goede wetenschappelijke reputatie. Voor het bedrijf ELANA geldt dat het verbeteren van de techniek, waardoor de toepasbaarheid

vergroot wordt, ervoor kan zorgen dat de techniek breder geëxploiteerd kan worden. Wetenschappelijke reputatie en commercieel gewin kunnen door de onderzoeker c.q. ELANA van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het hoofddoel van het onderzoek blijven de onder C1 genoemde patiëntengroepen, die door het toepassen van deze verbeterde techniek geholpen kunnen worden.

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. Dit project wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep die zelf ook de ELANA techniek (mede) heeft ontwikkeld. De techniek en de gehele operatie (inclusief de beste benadering van de vaten met intact houden van spieren en pezen) zijn al voor deze projectaanvraag geoefend op kadaver varkens en een humaan kadavermodel. Doordat de onderzoekers vele *in vitro*, *ex vivo* en *in vivo* experimenten met de ELANA techniek hebben uitgevoerd, beschikken de onderzoekers over een zeer uitgebreide ervaring met het uitvoeren van deze techniek voordat wordt gestart met de huidige lange termijn studie in varkens. De DEC is er daarom van overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. 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. Het project heeft een heldere strategie, weergegeven in één bijlage. De onderzoekers vragen in totaal ■ varkens aan waarvan ■ varkens zullen worden onderverdeeld in ■ subgroepen ■ met een levensduur van ■. De overige twee varkens worden enkel gebruikt wanneer complicaties optreden in het experiment. Er wordt gestart met de groep van ■ varkens met een overleving van ■ dagen. Aan de hand van de resultaten en mogelijke complicaties zal volgens het go/no-go principe worden bepaald of dezelfde experimentele handelingen worden uitgevoerd in de supgroep van ■, en vervolgens de supgroep van ■. Elk varken ontvangt een eenmalige operatie waarbij twee bypasses worden gemaakt: ■ een bypass met de ELANA clip techniek en ■ een bypass met de conventionele bypass techniek. Als donorvat wordt de ■ uit de achterpoten gebruikt. Peroperatief, na 3 weken en op de dag van de terminatie van het varken zal er een angiogram onder anesthesie worden

uitgevoerd. Een angiogram is een techniek om de doorgankelijkheid van het bloedvat te kwantificeren wat vergelijking over de tijd en tussen de dieren mogelijk maakt. Er wordt 1 week en 6 weken na de operatie onder anesthesie een niet-invasief echo-doppler onderzoek uitgevoerd waarbij de doorgankelijkheid van de anastomosen (verbinding huidig bloedvat met donor bloedvat) wordt gecontroleerd. Daarnaast wordt er op deze momenten bloed afgenomen ter controle van het effect van de metalen ELANA clip op het lichaam en de samenstelling van het bloed. Na de terminatie van het dier worden de bypasses uit ██████████ geprepareerd voor histologisch onderzoek.

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. De dieren worden postoperatief tijdelijk (gedurende één week) individueel gehuisvest. Bij huisvesting in groepen kunnen varkens aan elkaars littekenwond gaan zitten en een goede wondsluiting verstoren. Na één week is de wond bijna helemaal genezen en is het risico zeer klein dat de verdere wondgenezing negatief wordt beïnvloed door huisvesting in groepen. Individuele huisvesting zal ook moeten worden toegepast wanneer de dieren met elkaar vechten, indien het varken in groepsverband niet getolereerd wordt of omdat het laatste varken is van de overlevingsgroep.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De onderzoekers verwachten in een looptijd van anderhalf jaar █ varkens te gebruiken waarvan alle varkens matig ongerief zullen ondervinden. De dieren zullen ongerief ervaren als gevolg van het meerdere malen onder anesthesie worden gebracht en het ontwaken daarvan, het vrij prepareren van de bloedvaten en het maken van de bypasses, de bloedafname en de kortdurende individuele huisvesting. Eventuele complicaties kunnen circulatieproblemen in de achterpoten zijn met als gevolg oedeem, slechte mobiliteit/ immobiliteit en/of zelfs necrose. Indien dit optreedt tijdens de eerste subgroep van drie varkens zal er in overleg met de dierenarts en de IvD een alternatieve locatie voor een donorvat als oplossing gevonden worden alvorens doorgegaan zal worden met de rest van de studie.

12. De integriteit van de dieren wordt in fysiek opzicht aangetast vanwege het onder anesthesie brengen van de dieren, de bypass operatie in de bloedvaten ██████████ van het dier en het doden van de dieren aan het einde van het experiment. De integriteit van de dieren wordt ook gedragsmatig aangetast omdat de dieren een korte periode solitair gehuisvest worden en hierdoor de mogelijkheid wordt ontnomen om bepaalde aspecten van hun natuurlijke gedrag uit te oefenen.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd. Het humane eindpunt is bereikt wanneer een dier ernstig ongerief ondervindt als gevolg van: vasculaire complicaties, postoperatieve ontsteking welke niet verbeterd binnen 72 uur, ernstige wondinfectie van het operatielitteken, ernstig verminderde mobiliteit/teruggetrokken sociaal gedrag, niet eten gedurende 48 uur, niet drinken gedurende 36 uur of wanneer het dier zichtbaar lijdt ter beoordeling van de dierversorger, proefdierdeskundige en veterinaire. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat: als gevolg van de narcose zouden mogelijk 1-2 dieren door perioperatieve complicaties kunnen overlijden; om deze reden worden er 2 extra dieren aangevraagd.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De speciaal ontwikkelde ovale clip en ovale laser catheter zijn eerder al uitvoerig getest in een *in vitro* en *ex vivo* model op werkzaamheid en uitvoerbaarheid. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een trainingsmodel welke specifiek voor de ELANA techniek is ontwikkeld. Voor deze experimenten worden konijnenvaten gebruikt die verkregen zijn bij een consumptieslachterij. De konijnenvaten worden opgespannen in het trainingsmodel en er wordt water met een druk van 100 mmHg doorgespoeld, waarbij de druk vergelijkbaar is met de bloedvaten in de hersenen. De verschillende onderdelen van de ELANA techniek worden afzonderlijk van elkaar getest, en worden vervolgens in samenhang getest op verschillende eigenschappen, zoals de verhouding bloedvat en device, lekkage van het device, lekkage van de anastomose en hoe ziet de opening eruit (rafelig, glad, open, dicht). Tijdens de *ex vivo* experimenten kan echter niet worden gecontroleerd hoe de ELANA techniek zich verhoudt in combinatie met bloed en de werkzaamheid in een levend model. Het gaat om hele kleine onderdeeljes waar bloed in/tussen kan gaan zitten en de techniek toepassen in een levend dier is anders dan op een statisch model. Daartoe zijn de *in vivo* experimenten noodzakelijk om te kijken hoe het product zich op levend weefsel ontwikkelt. Het effect van het omringende milieu en omstandigheden in het lichaam, met bloed door de vaten met wisselende bloeddruk en flow, kan niet worden onderzocht in een *in vitro* opstelling.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Het open blijven van de anastomose, het lekvrij zijn en hoe de opening eruit ziet, worden al uitgebreid getest tijdens de *ex vivo*

experimenten en zullen bepalen (go/no-go) of het device *in vivo* zal worden getest. Tevens is er een go/no-go moment ingebouwd in de *in vivo* studie zelf. De resultaten in de ██████████, respectievelijk ██████████ overlevingsgroepen zijn bepalend of en zo ja op welke wijze de experimenten worden voortgezet. Omdat iedere bypass twee anastomosen betreft, kan het aantal proefdieren worden verminderd. Daarnaast wordt bij ieder dier ██████████ gebruikt. Tevens is er een beperkt aantal varkens nodig omdat de resultaten uit eerdere (gepubliceerde) studies al bepaalde verwachtingen en richtlijnen afgeven.

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. Uit uitgebreid *ex vivo* onderzoek is gebleken dat de oppervlakkig gelegen ██████████ van het varken (██████████) een geschikte afmeting hebben. Daarnaast zijn de bloedvaten en de bloedcirculatie erg vergelijkbaar met de mens. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door zeer bekwame personen zodat het eventuele ongerief zoveel mogelijk wordt beperkt. De commissie meent dat de juiste anesthesie en analgesie wordt toegepast rondom het verrichten van de operatie.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er zullen alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden omdat deze makkelijker samen te huisvesten zijn. Gezien het hier slechts om ██████████ varkens gaan welke uit een varkensfokkerij in Nederland worden verkregen heeft de DEC hier geen bezwaar tegen.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood omdat een primaire uitkomstparameter van deze studie alleen verkregen kan worden door middel van histologisch onderzoek. Daartoe dienen de ontvangende bloedvaten met de anastomosen uit het dier te worden verwijderd, waarna het dier niet verder kan leven. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel varkens worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek naar de lange termijn effecten van de ELANA techniek met de ovale clip en ovale laser katheter,

teneinde patiënten met een aneurysma te kunnen behandelen, 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 matig ongerief. Daar staat tegenover dat er van dit project belangrijke stappen kunnen worden verwacht in de richting van de toepasbaarheid van de ELANA technieken in patiënten met een aneurysma in bloedvaten van ██████████. Op korte termijn kunnen deze nieuwe ontwikkelingen van substantieel belang zijn voor mensen met een afwijking aan de bloedvaten in moeilijk te bereiken gebieden zoals in de hersenen of elders. De DEC kent ook daar veel gewicht aan toe. Een aneurysma is een veel voorkomende aandoening die kan leiden tot gezondheidsklachten en een fatale bloeding. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project bijdragen aan het toepasbaar maken van de ELANA techniek. Gezien de zeer ruime ervaring van de onderzoeksgroep is het is aannemelijk dat de doelstelling zal worden behaald. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk. Dieren met klinische symptomen worden naar de overtuiging van de commissie niet langer in proef gehouden dan strikt noodzakelijk voor het behalen van de doelstellingen. Ernstig ongerief wordt ten allen tijden voorkomen door de dieren dagelijks goed te observeren en uit de proef te nemen voor zich ernstig ongerief voordoet. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat deze lange termijn studie in varkens met de ovale clip en ovale laser katheter van de ELANA techniek een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC 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
AVD1150020172245

Bijlagen

2

Datum 20 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 juni 2017. Het gaat om uw project "Lange termijn onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor bloedvaten van 1.8 tot 2.5 mm". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020172245. 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:

20 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020172245

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur






Datum:
20 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020172245

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 30244197
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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



Datum:
20 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020172245

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: 31 december 2018
Titel project: Lange termijn onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor bloedvaten van 1.8 tot 2.5 mm
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor kleinere bloedvaten
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:

Functie:

Plaats:

Datum:



Utrecht

14 juni 2017

Datum:

20 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020172245



> 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
AVD1150020172245
Bijlagen
2

Datum 20 juni 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 20 juni 2017
Vervaldatum: 20 juli 2017
Factuurnummer: 172245
Ordernummer: o.v.v. CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020172245	€ 1035,00

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

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1150020172245

Bijlagen

1

Datum 17 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 19 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Lange termijn onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor bloedvaten van [REDACTED]" met aanvraagnummer AVD1150020172245. 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 "Lange termijn onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor bloedvaten van 1.8 tot 2.5 mm" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2017 tot en met 31 december 2018.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 juni 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:
17 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020172245

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: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 december 2018, voor het project "Lange termijn onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor bloedvaten van [REDACTED] [REDACTED]" met aanvraagnummer AVD1150020172245, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project is Research & Laboratory Manager verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 19 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 juni 2017, ontvangen op 16 juni 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Dutch Landrace -varken, Lange termijn onderzoek naar verbetering van de Elana techniek voor bloedvaten van 1.8 tot 2.5 mm				
	Varkens (Sus scrofa domesticus) /	11	Matig	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Aanvraagnummer:
AVD1150020172245

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:
AVD1150020172245

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 onvereenigbaar 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:
AVD1150020172245

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 W17-12		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS20172265	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	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? Ja > Vul uw deelnemernummer in [redacted] Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie [redacted]

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [redacted]

KvK-nummer [redacted]

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

Straat en huisnummer [redacted]

Postbus [redacted]

Postcode en plaats [redacted] [redacted]

IBAN [redacted]

Tenaamstelling van het rekeningnummer [redacted]

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [redacted] Dhr. Mw.

Functie [redacted]

Afdeling [redacted]

Telefoonnummer [redacted]

E-mailadres [redacted]

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

(Titel) Naam en voorletters [redacted] Dhr. 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 checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [REDACTED] | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 9 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 9 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium-D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedingssupplement 3-HB
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------|
| Naam DEC | [REDACTED] |
| Postadres | [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

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.
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	████████████████
Datum	- -
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.

Multiple Acyl Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD; or glutaric aciduria type II; OMIM #231680) is a rare inborn error of metabolism (IEM) with a heterogeneous clinical presentation ranging from patients with a neonatal-onset with congenital anomalies (type I) or with a neonatal-onset without congenital anomalies (type II) to patients with a relatively milder, later onset (type III). Severely affected MADD-patients (type I and II) typically display symptoms such as life-threatening metabolic derangement, cardiomyopathy, leukodystrophy and/or severe respiratory distress often resulting in neonatal death. Despite early diagnosis and treatment, these patients usually only survive from a few weeks up to a few years. Regular treatment includes dietary fat and protein restrictions, supplementation of riboflavin, glycine and L-carnitine and the avoidance of fasting. In case of metabolic derangement, glucose is administered to the patient to restore the metabolic balance. This treatment is generally sufficient in type III patients. There is no officially registered, efficacious treatment for severely ascertained type I and type II patients. Patients develop severe symptoms despite adhering to optimal treatment regimens, suggesting an additional energy shortage. [Frerman & Goodman 2004]

Ketone bodies form an important energy source for extra hepatic tissues such as skeletal and cardiac muscle. Contrarily to fatty acids, ketone bodies, like glucose, are able to cross the blood brain barrier. In healthy individuals, only low concentrations of ketone bodies are detectable in blood. Periods of metabolic stress such as fasting or starvation result in an increased mitochondrial fatty acid oxidation (mFAO) in order to meet the high energy tissue demands. This leads to increased concentrations of ketone bodies in blood, providing an alternative energy source for glucose. [Olpin 2003, Bouteldja 2014, Fukao 2014]

Patients with mFAO disorders including MADD are unable to oxidize fatty acids and form ketone bodies as an alternative energy source. This leads to a major disruption in the energy metabolism especially when the glucose supply becomes exhausted. [Olpin 2003] Supplementation of ketone bodies may provide an effective therapeutic option as it can bypass the shortfall in energy metabolism. The three ketone bodies are acetoacetate, 3-hydroxybutyrate (3-HB) and acetone. Whereas acetoacetate is chemically instable and acetone volatile,

[REDACTED]

[REDACTED]

This raises the prospect of a new treatment target in severe MADD and possibly other IEMs with a clinical presentation caused by energy deficiency. 3-HB supplementation has only been used in a compassionate use setting, as an experimental, therapeutic supplement in patients where all other treatment options had been exhausted and proven ineffective. [REDACTED]

[REDACTED]

One of the remaining key issues for the limited clinical application of 3-HB in MADD-patients concerns the fact that the pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of 3-HB supplementation have not yet been elucidated.

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 aim of this research project is to gain more insight in 3-HB supplementation by investigating the efficacy of supplementation of various 3-HB mixtures in terms of pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action.

[REDACTED]

3.3 Relevance

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

Increased knowledge on pharmacokinetic parameters of 3-HB and the amount of 3-HB deposition in different tissues post-administration will improve the insight in 3-HB supplementation.

[REDACTED]

The experiments will be performed in a healthy as well as a diseased (MADD) rat model to investigate whether the pharmacokinetic parameters and tissue deposition of 3-HB mixtures are dependent on the metabolic capacity of the metabolism, in particular mFAO activity. If 3-HB uptake is increased in the diseased rat model compared to the healthy rat model, this emphasizes the importance of 3-HB supplementation in MADD-patients even more.

3-HB is currently supplemented in the form of sodium-D,L-3-hydroxybutyrate. As a result, the therapy needs to be considered with caution due to the iatrogenically increased sodium load.

This is an important contraindication for example, due to increased fluid retention. Fortunately, 3-HB supplementation appears to exert more positive than negative effects in the patients described so far. However, it remains a complex decision to start and/or withhold 3-HB supplementation and to increase and/or decrease the dosage due to the relatively limited amount of knowledge and evidence regarding 3-HB supplementation including the possible associated risks and mechanisms-of-action.

[REDACTED]

It is not possible to already perform these studies in patients without thorough substantiation in experimental animals. The patients requiring 3-HB supplementation are severely ill and have a vulnerable metabolic balance. Even minor influences such as slightly adjusting the current prescribed 3-HB therapy or an additional hospitalization to initiate the therapy adjustments are risk factors for life-threatening metabolic derangements in severe MADD. The proposed experiments in rats are therefore essential.

Altogether, this study will elucidate the pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of 3-HB supplementation. Therefore, it will provide a first step towards widespread application of this supplement for MADD-patients. 3-HB supplementation may also be beneficiary in other IEMs with a clinical presentation caused by energy deficiency. Study results may therefore be generalized to a larger population.

3.4 Research strategy

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

To answer research question A, we will investigate the pharmacokinetic parameters after administration of a single, oral dose of 3-HB. Five groups of nine healthy rats will receive one oral dose of 3-HB using various doses [REDACTED]. Venous blood samples will be collected at nine different time points between 0 minutes and 8 hours post-administration. These samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED]. These measurements will allow for calculation of the pharmacokinetic parameters. 3-HB levels will also be determined at these same time points using a blood β -ketone meter in order to investigate the accuracy of the device and to establish the potential of its application in patients under these circumstances. It should be noted that measurements with the β -ketone meter cannot replace the venous blood samples since this device does not allow for [REDACTED]. After completion of the experiment and termination, the following tissue samples will be collected: skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue for further analysis according to standard procedures of experiment B in the context of possible sample size reduction (see 3.4.3).

To answer research question B, we will analyze 3-HB deposition in different tissues at three different time points post-administration: t_{max} (identified in experiment A), one time point before t_{max} and one time point at a maximum of 24 hours after t_{max} . To this end, healthy rats will be divided among three groups of each nine rats. Each group will receive the same optimal 3-HB dose (identified in experiment A; first dosage which reaches peak plasma concentration in shortest time interval), but sacrificed at a different time point post-administration. Venous blood samples will be collected at up to nine different time points between 0 minutes post-administration and time of termination. At all moments of venous blood collection, a blood β -ketone meter will additionally be used for immediate measurement of the 3-HB concentration for similar reasons as described before. After termination, the following tissue samples will be collected: skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue. All blood samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED]. This will allow for calculation of the pharmacokinetic parameters. 3-HB, [REDACTED] will also be analyzed in tissue homogenates in order to determine the deposition of the respective metabolites in the different tissues.

To answer question C, we will investigate the pharmacokinetic parameters and organ tissue deposition after a single oral dosage of four different [REDACTED] 3-HB mixtures at two different time points: t_{max} (identified in experiment A) and the time point at a maximum of 24 hours after t_{max} . Four groups of nine rats will receive the same optimal 3-HB dosage (identified in experiment A) in different [REDACTED] mixtures [REDACTED] and will be terminated at t_{max} . Four other groups of nine rats will receive the same optimal 3-HB dosage in different [REDACTED] mixtures [REDACTED] but will be terminated at the second time point. Venous blood samples will be collected at up to nine different time points between 0 minutes post-administration and time of termination. At all moments of venous blood collection, a blood β -ketone meter will additionally be used for immediate measurement of the 3-HB concentration for similar reasons as described before. After termination, the following tissue samples will be collected: skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue. All blood samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED]. This will allow for calculation of the pharmacokinetic parameters. 3-HB, [REDACTED] will also be analyzed in tissue homogenates in order to determine the deposition of the respective metabolites in the different tissues.

The three research questions will first be addressed in a healthy rat model. In order to investigate whether the pharmacokinetic parameters and organ tissue deposition of 3-HB mixtures are dependent on the activity of the metabolism, the three experiments will be exactly repeated in a MADD rat model: riboflavin deficient rats. [Goodman 1981, Olpin 1982, Ross 1987, Montgomery 1991] As the

pharmacokinetic parameters and organ tissue deposition might be influenced by the activity of the metabolism, the optimal 3-HB dose and t_{max} may be different between the healthy and diseased model. Therefore it is not possible to limit the number of groups in the MADD rat model experiments based on the outcomes of the experiments in the healthy rat model.

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.

In this experiment, we are focusing on the pharmacokinetic parameters of 3-HB and its deposition in different tissues rather than on the therapeutic effects of 3-HB supplementation. It is not possible to perform these experiments 3-HB-patients as this would potentially impose life-threatening risks. It is also not possible to perform these experiments in healthy subjects or patients, as 3-HB tissue deposition cannot be determined without invasive tissue dissection for further analysis. Investigations in an in vitro model (i.e. fibroblasts studies) are not applicable as this does not provide an adequate model system to assess pharmacokinetic parameters, and to determine tissue 3-HB deposition. An in vivo model (i.e. an intact organism) is required to determine the contribution of different organs to the abovementioned parameters. It is considered a good starting point to study these mechanisms in a healthy animal model first and subsequently in a diseased animal model. As a genetically modified MADD-rodent-model does not exist, alternatives have been considered. In the past, riboflavin deficient rats have been used as an animal model for MADD. Despite the fact that dietary induced riboflavin deficiency in rats does not induce severe (neonatal) disease symptoms, this model mimics the biochemical and metabolic status of MADD-patients caused by a reduced mFAO activity. [Goodman 1981, Olpin 1982, Ross 1987, Montgomery 1991] In reproductive performance experiments, dietary induced riboflavin deficiency in young female rats led to severely impaired reproduction and fetal resorption. [Duerden 1985] Therefore, dietary induced riboflavin deficiency in rats serves as an appropriate alternative animal model for MADD in order to investigate whether the pharmacokinetic parameters, tissue deposition and optimal composition of the 3-HB mixture are dependent on the activity of the metabolism, in particular mFAO.

Repetitive blood sampling in a short time interval is necessary in this experiment. Having considered the blood volume in both animal species, we will use a rat model instead of a mouse model for our studies. The type of experimental procedures that will be performed include: reversal of light-dark cycle, weighing, identification method, administration of single, oral dose of 3-HB via oral gavage technique, repetitive blood sampling, terminal cardiac puncture and termination via cervical dislocation both under inhalation anaesthesia. The overall level of discomfort for the animals in the healthy animal model is estimated to be mild. Additionally, experiments A, B & C will be performed in a rat model for MADD. To this end, riboflavin deficiency will be induced via a riboflavin deficient diet prior to the start of the experimental procedures. This diet will be continued during the experiments. The overall level of discomfort for those animals is estimated to be moderate due to the modified dietary regimen.

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.

Experiment B & C depend on the outcome of experiment A as the optimal dose and t_{max} which are identified in experiment A, will be used in experiment B & C. If possible, depending on the established t_{max} , animal tissues of an animal group of experiment A will be further analyzed according to standard procedures of experiment B, to already form one of the two additional time point groups of experiment B. The animals of experiment B, [REDACTED], will serve as control group for experiment C.

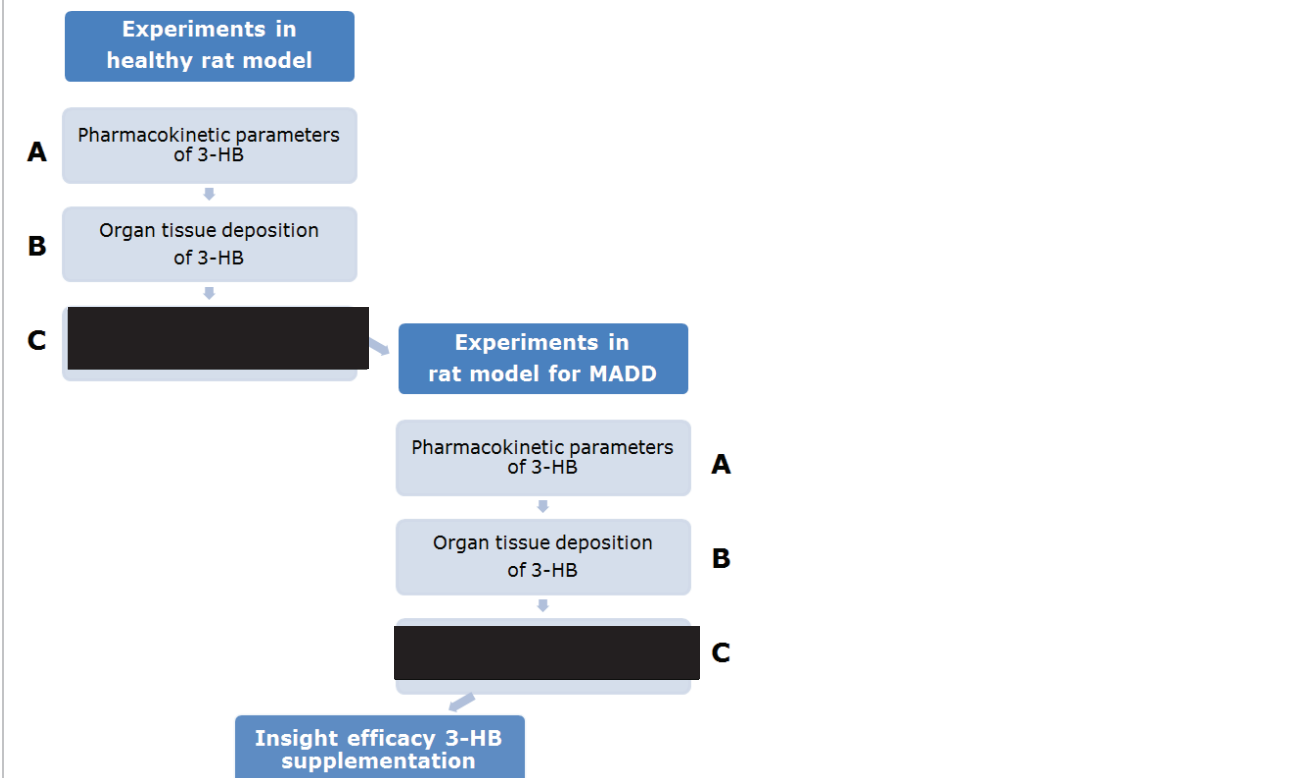
After experiment A, a new power analysis will also be performed based on the VC and effect size in this experiment to evaluate whether the number of animals per group in experiment B & C should be adapted.

The experiments in the MADD rat model will only be performed after completion of the experiments in healthy rats. A go/no-go criteria for the start of the experiments in the MADD rat model is confirmation of dietary induced riboflavin deficiency through the activation coefficient of erythrocyte glutathione reductase (EGRAC) [Prentice 1981, Olpin 1982]. An EGRAC status of ≥ 1.3 will be considered as proven

riboflavin deficiency. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7^e edition]

If at any point during the experiments, administration of 3-HB to the rats or the dietary inducement of riboflavin deficiency is proven to be toxic or harmful and results in death of the animal or non-acceptable side effects, possible causes will be investigated thoroughly. The causative factor (for example high 3-HB dose) will be excluded from all subsequent experiments. Only if the 3-HB supplementation is well tolerated by the animals, the experiment will be continued with the next step.

A schematic representation of the experiments is shown in the figure below. Together all experiments will provide improved insight on pharmacokinetic parameters and tissue deposition of various mixtures of 3-HB post-administration.



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	Pharmacokinetics parameters and 3-HB deposition in organ tissues after supplementation of various 3-HB mixtures
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	



Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.

[REDACTED]

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

[REDACTED]

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Pharmacokinetics parameters and 3-HB deposition in organ tissues after supplementation of various 3-HB mixtures

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.

The aim of this experiment is to gain more insight in 3-HB supplementation by investigating the efficacy of supplementation of various 3-HB mixtures in terms of pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action.

[REDACTED]

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

Experimental studies will start after two weeks of acclimatization. The animals will be group housed during the acclimatization period and throughout all experiments. Drinking water and standard laboratory diet will be provided at libitum. Because the ketone body metabolism is affected by the circadian rhythm

[Gasquet 1977, Allen 2008], the 12 hour light - 12 hour dark cycle of the rats will be reversed directly upon arrival at the facility. Ketone body concentrations in rats are highest during night time, corresponding with the rodent's activity period. Experiments will only be performed after reversal of the light-dark cycle to ensure that the circadian rhythm (and thus activity period) of the rat mimics the human activity period as much as possible during the experiments. Prior to the start of the experiment, all rats will be weighed to ensure a minimal weight of 300 grams. A control blood sample will be collected (200 μ L) via the tail vein. [REDACTED]

The dosages of the 3-HB supplementation in rats are based on the dosage regimens of 3-HB supplementation in MADD-patients. [REDACTED]

[REDACTED] Therefore, determined pharmacokinetic parameters and 3-HB deposition in tissues in rats can be translated back to the human situation as accurately as possible.

For experiment A, rats will be randomly divided into five dosage groups of nine rats which all receive one oral dose of 3-HB at an increased dosage [REDACTED]. The group-corresponding oral dose of 3-HB will be administered via oral gavage technique. Venous blood samples (200 μ L) will subsequently be collected at nine different time points between 0 minutes and 8 hours post-administration via tail vein bleeding to determine the concentration of [REDACTED]. The blood sample at the time of sacrifice (t=8 hours) will be collected as terminal bleed via cardiac puncture. At all moments of blood collection, a blood β -ketone meter will be used for immediate, cage-side measurement of 3-HB concentration (samples of 5 μ L each, collected via tail vein bleeding) in order to investigate the accuracy of the device and consider the potential application in patients under these circumstances. They cannot replace the venous blood samples since a blood β -ketone meter does not allow for determination of [REDACTED]. Measurements with this device will be compared with the gold standard of laboratory analyses in order to test whether this device might be applicable in the monitoring of 3-HB concentrations in patients on 3-HB supplementation. At t=8 hours, all animals will be deeply anaesthetized by the inhalation anaesthetic isoflurane. A heart puncture will be performed to collect the terminal blood sample. The animals will subsequently be euthanized by cervical dislocation. All blood samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED]

[REDACTED] After completion of the experiment and termination, the following tissue samples will be collected: skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue for further analysis according to standard procedures of experiment B in the context of possible sample size reduction (see 2.D).

For experiment B, rats will be randomly divided into three groups of nine rats. Each group rats will be sacrificed at a different time point: t_{\max} (identified in experiment A), one time point before t_{\max} and one time point at a maximum of 24 hours after t_{\max} . The optimal 3-HB dose identified in phase A of the experiment (first dose which reaches peak plasma concentration in shortest time interval) will be administered to each rat via oral gavage technique. Venous blood samples (200 μ L) will be collected at

up to 9 different time points between 0 minutes post-administration and time of termination. These blood samples will be collected via tail vein bleeding. The blood sample at the time of sacrifice will be collected as terminal bleed via cardiac puncture. At all moments of blood collection, a blood β -ketone meter will be used for immediate, cage-side measurement of 3-HB concentration (samples of 5 μ L each, collected via tail vein bleeding) for similar reasons as described before. Each group of animals will be sacrificed at the group-corresponding time point. At the time point of sacrifice, animals will be deeply anesthetized by the inhalation anaesthetic isoflurane. A heart puncture will be performed to collect the terminal blood sample. The animals will subsequently be euthanized by cervical dislocation. After sacrifice, the different tissues (skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue) will be collected for measurement of [REDACTED] in order to determine the tissue deposition. All collected blood samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED] as described before. This will allow for calculation of the pharmacokinetic parameters.

For experiment C, rats will be randomly divided into eight groups of nine rats. Four groups will receive the optimal 3-HB dosage (identified in experiment A) but in different [REDACTED] mixtures [REDACTED] and be sacrificed at t_{max} (identified in experiment A). The four remaining groups of nine rats will receive the same optimal 3-HB dosage in different [REDACTED] mixtures [REDACTED] but be terminated at another time point at a maximum of 24 hours after t_{max} . The single dosages of 3-HB will be administered via oral gavage technique. Venous blood samples (200 μ L) will be collected at up to 9 different time points between 0 minutes post-administration and time of termination via tail vein bleeding. The blood sample at the time of sacrifice will be collected as terminal bleed via cardiac puncture. At all moments of blood collection, a blood β -ketone meter will be used for immediate, cage-side measurement of 3-HB concentration (samples of 5 μ L each, collected via tail vein bleeding) for similar reasons described under experiment A. At the group-corresponding time point, animals will be deeply anesthetized by the inhalation anaesthetic isoflurane. A heart puncture will be performed to collect the terminal blood sample. The animals will subsequently be euthanized by cervical dislocation. After sacrifice, the different tissues (skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue) will be collected for measurement of [REDACTED] in order to determine the tissue deposition. All blood samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED] as described before. This will result in calculation of the pharmacokinetic parameters.

Experiments A, B & C will be repeated exactly in riboflavin deficient rats, an animal model for MADD [Goodman 1981, Olpin 1982, Ross 1987, Montgomery 1991], in order to investigate whether the pharmacokinetic parameters and tissue deposition of 3-HB mixtures are dependent on the metabolic capacity of the metabolism, in particular the mitochondrial fatty acid oxidation activity. Riboflavin deficiency will be induced via a riboflavin deficient diet prior to the experiment for approximately 6 weeks. The diet will be provided ad libitum and continued during the experiments. All rats will be weighed prior to the start of the riboflavin deficient diet and consistently each subsequent week.

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

Due to lack of information on variability and effect size for these specific experiments, it is not possible to perform a power analysis for sample size calculation. Based on our experience that the variation coefficient (VC) for metabolic parameters such as blood glucose and ketone body levels is generally about 15%, and effect size about 25%, we expect a sample size of nine animal per group (power = 90%).

Therefore, the sample size for experiment A is calculated to be nine animals per group. The total number of animals in this experiment is 5 (groups) x 9 (animals/group) x 2 (healthy model and MADD model) = 90 rats.

The sample size for experiment B is calculated to be nine animals per group. The total number of animals in this experiment is 3 (groups) x 9 (animals/group) x 2 (healthy model and MADD model) = 54 rats.

The sample size for experiment C is calculated to be nine animals per group. The total number of animals in this experiment is 4 (groups) x 9 (animals/group) x 2 (time point) x 2 (healthy model and MADD model) = 144 rats.

Therefore, 288 rats in total will be included in this experiment. No additional rats will be enrolled as no drop-out due to the short duration of the experiments is expected. After experiment A, a new power analysis will be performed based on the VC and effect size in this experiment to evaluate whether the number of animals per group in experiment B & C should be adapted.

B. The animals

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

Healthy, inbred male Wistar rats weighing ≥ 300 g, will be used in the experiments. The total number of animals used is 288 rats. Calculation of the sample size has been explained above. Having regard to the total amount of blood volume of the animal species (since the experiments concern repetitive blood sampling), experiments cannot be performed in mice. Only rats with a weight of 300 g or more will be included to ensure that total volume of blood sample collections does never exceed 10% of the total amount of the animal's blood volume. The mean blood volume of a 300 g weighing rat is 19.2 mL (estimated blood volume in a rat is 64 mL/kg [Diehl 2001]), thus total amount of blood collection per rat should not exceed 1.92 mL. During the experiment a maximum of 10 blood samples (200 μ L) + simultaneous cage-side measurement with a blood β -ketone meter (5 μ L) (in total 205 μ L per sample) will be collected, including one terminal blood sample. Therefore, a maximum of $9 \times 205 \mu\text{L} = 1.845$ mL blood will be collected during the experiment. Thus, the total amount of blood collected during the experiment will never exceed 10% of the animal's total blood volume.

All experiments will only be performed in male Wistar rats for multiple reasons. Only male rats will be used as the ketone body metabolism activity differs between male and female sex, possibly due to different plasma levels of estradiol. [Jikumaru 2007] Therefore, the reproductive cycle in female rats might interfere with the study results due to alterations in the estrous cycle. The strain Wistar rats is widely used for pharmacokinetic experiments in rats.

[REDACTED], established pharmacokinetic parameters and 3-HB deposition in tissues in rats can be translated to the human situation as accurately as possible. As it is unknown to what extent ketone body metabolism differs among different strains of rats and/or is influenced by the sex different effects, all experiments will be performed in male Wistar rats in order to avoid confounding factors as much as possible.

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: In these experiments, the pharmacokinetic parameters and tissue deposition after a single, oral dose 3-HB will be investigated in a healthy animal model and a diseased animal model with compromised FAO capacity. We are interested in the pharmacokinetic parameters of 3-HB and tissue deposition of 3-HB mixtures rather than the therapeutic effects. It is considered a good starting point to first study these mechanisms in a healthy animal model. Investigations in an in vitro model (i.e. fibroblast studies) are not applicable as this approach does not provide an adequate model for the assessment of pharmacokinetic parameters in vivo, and for determination of 3-HB deposition in tissues. An in vivo model (i.e. an intact organism) is required to account for the contribution of different cells and organs to the abovementioned parameters. Invertebrates cannot be used due to their limited blood volume and the inability of adequate dose administration. It is not possible to perform these experiments or already attempt a similar approach in patients without thorough substantiation. The patients requiring 3-HB supplementation are severely ill and have a vulnerable metabolic balance. Even minor influences such as slightly adjusting the current prescribed therapy or an additional hospitalization to initiate the therapy adjustments are risk factors for life-threatening metabolic derangements in severe MADD. The proposed experiments in rats are therefore essential. Additionally, the context of the experiment requires tissue excision for further analysis to determine the 3-HB deposition in specific organs, and can therefore not be performed in healthy humans or patients.

Reduction: Sample size calculations have been performed to minimize the number of animals needed as much as possible. After experiment A, a new power analysis will be performed based on the VC and effect size in this experiment to evaluate whether the number of animals per group in experiment B & C can be further reduced. The optimal dose and t_{max} discovered in experiments A will be used in experiments B & C. Therefore, experiment B and C can be performed with a minimum number of rats as only one dose concentration needs to be investigated and t_{max} has already been established. If possible, depending on the established t_{max} , animal tissues of an animal group of experiment A will be further analyzed according to standard procedures of experiment B, to already form one of the two additional time point groups of experiment B, thereby reducing the number of animals. This requires that we will collect and storage the tissues of animals in experiment A also. The animals of experiment B, which receive a racemic 3-HB mixture, will serve as control group for experiment C. Regarding the experiments in a healthy as well as a MADD rat model, as the pharmacokinetic parameters and tissue deposition might be influenced by the metabolic activity, the optimal 3-HB dose and t_{max} might differ between both models. Therefore it is not possible to limit the number of groups in the MADD rat model experiments based on the outcomes of the experiments in the healthy rat model.

After careful consideration, we decided not to include a Latin square (two times a 5x5 square for testing 5 dosages with n=10 per sample; thus 20 animals required for experiment A in both models) in the experimental design of experiment A for the following reasons:

- To enable the use of a Latin square, additional animal experiments are required to determine the 3-HB half-life and the duration of substrate presence in the tissues as these factors might influence the pharmacokinetic parameters. The 3-HB half-life should be known to determine the minimum wash-out period. Additionally, the amount of 3-HB uptake by the tissues might be influenced by the degree of 3-HB tissue saturation. It is unknown how long the 3-HB is present in the different tissues. A minimum of 36 additional animals is required to investigate these possible confounding factors in the healthy and MADD model (9 animals per model for the 3-HB half-life and 9 animals per model to determine the duration of substrate presence) at only one additional time point. To enable adequate interpretation of results, this should be carried out at multiple timepoints, requiring even more animals.
- It is practically not feasible as experiment A requires repetitive blood sampling in a short time interval. If experiment A is performed according to a Latin square, the total volume of blood sample collections would exceed 10% of the total amount of the animal's blood volume. Therefore after each tested dosage, an additional recovery period of at least 2 weeks is necessary for the recovery of blood volume for animal welfare reasons as well as to exclude hemodynamic effects as influencing factors in the subsequent dosage tests. [Diehl 2001]

Therefore, total duration of experiment A per animal will reach at least 11 weeks instead of 8 hours.

- In the context of animal welfare, this does not seem desirable.
 - Metabolic activity, including ketone body metabolism, might be influenced by age. [Bougneres 1986, Higashino-Matsui 2012] When using a Latin square, this confounding factor cannot be ruled out and results cannot be compared adequately.
 - This approach will deliver a significant study delay of about 3 months.
- With this experimental design it is not possible to “further use” the tissues of the animals from experiment A as a group in experiment B since it is unknown how long the 3-HB substrates remain present in the tissues after repeated administration of different dosages. Consequently, the proposed reduction of potentially 18 animals (9 animals per model) is no longer possible.

Refinement: Experimental procedures will be executed by trained and experienced staff. The experiment has been divided into different subparts in order to enable the implementation of clear go/no go criteria. Only if 3-HB dosages administered in experiment A turn out to be tolerated well by the animals, we will continue with experiment B and subsequently experiment C. Only after completion of all experiments in a healthy animal model, experiments will be repeated in a diseased animal model. Reversal of the light-dark cycle will be performed directly after arrival at the facility. The animals are already in a box upon arrival. Therefore, introducing the reversed rhythm as a normal rhythm immediately upon arrival will cause a lesser amount of stress rather than adapting the rhythm at a later stage. Experiments will only start after two weeks of acclimatization in order to minimize the stress experience. The method of blood sample collection by tail-nick procedure was chosen based from the perspective of animal welfare as we expect that it will impose the least discomfort to the animals.

The animals included in the MADD model will receive a riboflavin deficient diet prior to the start and throughout the experiment. The biochemical status of riboflavin deficiency will be achieved within approximately six weeks. [Prentice 1981, Olpin 1982, Liao 1987, Ross 1987, Patterson 1988] This will be confirmed by analysis of the activation coefficient of erythrocyte glutathione reductase (EGRAC) in washed erythrocyte preparations [Prentice 1981, Olpin 1982] isolated from a control blood sample (200 μ L) collected one to two days before the start of the experiment in order to allow for sufficient recovery time from this blood draw. An EGRAC status of ≥ 1.3 will be considered as proven riboflavin deficiency. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7^e edition] Other relevant metabolites which can be used to improve characterization of the model will also be measured such as acylcarnitines, organic acids, amino acids, acetoacetate, lactate and electrolytes. A small residual content of riboflavin allows for continued growth and/or prevention of excessive weight loss and prevents overt clinical signs of deficiency such as alopecia, weakness, decreased growth and dermatitis. [Prentice 1980, Nutritional Requirements of Laboratory Animals 1995, Yates 2001] Therefore, the diet will not be entirely depleted from riboflavin, but will still contain a reduced amount of riboflavin to minimize the risk of the most severe side-effects. Dietary induced riboflavin deficiency in rats does not induce severe (neonatal) disease symptoms similar to severely ascertained MADD-patients. However, this model mimics the biochemical and metabolic status of MADD-patients caused by a reduced mFAO activity. [Goodman 1981, Olpin 1982, Ross 1987, Montgomery 1991] In reproductive performance experiments, dietary induced riboflavin deficiency in young female rats led to severely impaired reproduction and fetal resorption. [Duerden 1985] Therefore, dietary induced riboflavin deficiency in rats can be used as an alternative animal model for MADD in order to investigate whether the activity of the metabolism, in particular mFAO, influences the main outcome parameters.

During the acclimatization period, if applicable the period of dietary inducement of riboflavin deficiency, and the subsequent experiments, all animals will be checked once a day to determine their general health status and assess the grade of discomfort the animal is possibly experiencing. This daily check also ensures that in the unlikely event a humane endpoint is reached, this will be noticed quickly and precaution measures can be implemented immediately.

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

on the environment.

The overall level of discomfort for the rats in the healthy animal model is estimated to be mild. The overall level of discomfort for the MADD rats is estimated to be moderate due to the modified dietary regimen. To refine the experiment several precautionary measurements will be taken. Regarding the repetitive blood sampling in the context of the experiment: the first blood samples will be collected via a small cut in the lateral tail vein. Subsequent serial blood samples will be obtained by gently removing the scab without performing an additional cut. Rats included in the MADD group will be fed a riboflavin deficient diet. To minimize the risk on side-effects, the diet will not be entirely depleted from riboflavin. A small residual content of riboflavin allows for continued growth and/or prevention of excessive weight loss and prevents overt clinical signs of deficiency. [Prentice 1980, Nutritional Requirements of Laboratory Animals 1995, Yates 2001] Therefore, the modified diet will contain a reduced amount of riboflavin. Apart from mimicking the biochemical and metabolic status of MADD-patients, no disease symptoms similar to the severe (neonatal) disease phenotype in patients are to be expected. [Goodman 1981, Olpin 1982, Ross 1987, Montgomery 1991]

If at any point during the experiments, administration of 3-HB to the rats is proven to be toxic and results in death of the animal or non-acceptable side effects, possible causes will be investigated thoroughly. We will discuss the case extensively with the Animal Welfare Body. The causative factor (for example high 3-HB dose) will be excluded from all subsequent experiments. Only if the 3-HB supplementation is well tolerated by the animals, the experiment will be continued with the next step. The same holds for the induced riboflavin deficiency using a riboflavin deficient diet. If at any point, the modified dietary regimen results in overt clinical signs of deficiency, the diet and experiment will be terminated. Only if the riboflavin deficient diet is well tolerated by the animals, the experiment will be continued with the next step.

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.

An extensive literature search has been performed in order to ensure that the proposed experiments have not been performed previously.

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.

The animals included MADD rat model group will receive a riboflavin deficient diet prior to the start and during the experiment. The modified diet is required to induce riboflavin deficiency in the respective rats and thus create a diseased animal model which mimics the biochemical status and metabolic capacity of MADD-patients.

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?

Unintended side-effects of the 3-HB or adverse effects of the administration method. Unintended side-effects of the modified dietary regimen in rats included in the experiments in the MADD rat model.

Explain why these effects may emerge.

A possible side-effect of 3-HB supplementation in humans includes the occurrence of diarrhoea. It is expected this side effect only occurs after long-term and particularly high dose 3-HB supplementation. Long-term diarrhoea might result in dehydration. Potential adverse effects of the administration method via oral gavage technique are perforation of the oesophagus or stomach or respiratory distress. Potential side-effects of dietary induced riboflavin deficiency involve alopecia, weakness, decreased growth and dermatitis. [Nutritional Requirements of Laboratory Animals 1995]

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

Rats will receive the 3-HB dose only once. In experiment A, all rats will already be euthanized within 8 hours. In experiment B & C, all rats will be euthanized at a maximum of 24 hours after t_{max} . Furthermore, all rats will receive only a single, optimal dose of 3-HB. Therefore the occurrence of diarrhoea and subsequent dehydration is considered unlikely.

In the event diarrhoea does occur, animals will be carefully monitored for signs of dehydration such as sunken eye sockets a dull coat, reduced elasticity of the skin and less active or lethargic behaviour. In case of temporary diarrhoea, the experiment will be continued. In case of diarrhoea which persists for longer than 8 hours or present signs of dehydration, the experiment will be prematurely terminated for the individual animal.

Administration via oral gavage will only be performed by trained personnel. Directly afterwards, animals will be carefully monitored for signs of laboured breathing or respiratory distress for 5 minutes. If these signs are present and persistent, the experiment will be prematurely terminated for the individual animal.

A small residual content of riboflavin allows for continued growth and/or prevention of excessive weight loss and prevents overt clinical signs of deficiency. [Prentice 1980, Nutritional Requirements of Laboratory Animals 1995, Yates 2001] Therefore, the diet will not be entirely depleted from riboflavin, but will still contain a reduced amount of riboflavin to minimize the risk on side-effects. In the event clinical signs of riboflavin deficiency do occur, the experiment will be prematurely terminated for the individual animal according to the defined humane endpoints.

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 a humane endpoint is suspected in an individual animal, the case will be discussed with the Animal Welfare Officer. The experiment will be prematurely terminated for an individual animal in case it has been determined that a humane endpoint has been reached. Humane endpoints are defined as pica-behaviour (defined as eating bedding material or other strange, non-food objects) or other signs of pathology, such as weight loss of 15% or more of the initial body weight, decreased grooming apparent by an unkempt coat and/or the presence of "red tears" for ≥ 24 hours. No a priori reasons for euthanization of the animals will be: temporary nausea (defined as temporarily lifting of head in a motion resembling gagging, for ≤ 8 hours) or temporary diarrhea (for ≤ 8 hours). If the nausea and/or diarrhea is present for ≥ 8 hours or combined with signs of dehydration, the experiment will be prematurely terminated for an individual animal.

Prior to the experiments in the MADD rat model, riboflavin deficiency will be induced using a riboflavin deficient diet. If inducement of riboflavin deficiency via a riboflavin deficient diet results in any of the abovementioned situations, specifically a weight loss of 15% or more of the initial body weight at the start of the modified dietary regimen, alopecia, profound weakness or dermatitis, the diet will be discontinued and the case will be discussed with the Animal Welfare Officer. If a humane endpoint has been reached, the experiment will not be initiated or, in case it has already started, the experiment will be stopped. In both cases, the animal will be prematurely terminated.

Indicate the likely incidence.

As a) only a single oral dose of 3-HB is administered to the rats and b) the duration for the proposed experiments varies between only eight hours to a maximum of 24 hours after t_{max} , we do not expect that any individual rat will reach a humane endpoint requiring termination of the experiment to reduce further distress. In the experiments in a MADD rat model, animals will be fed a riboflavin deficient diet prior to the start of the experiment to induce riboflavin deficiency. Due to the small residual content of riboflavin in the modified diet, the occurrence of side-effects mentioned before is unlikely. Animals will be checked daily from the day of start of the modified dietary regimen to ensure that in the unlikely event a humane endpoint is reached, this will be noticed quickly and precaution measures can be implemented immediately.

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').

Reversal of the light-dark cycle: directly upon arrival at the facility, the 12 hour light - 12 hour dark cycle of the rats will be reversed. The experiments will only start after two weeks of acclimatization. The discomfort is expected to be mild.

Weighing: All rats will be weighed prior to the start of the experiment to ensure a minimal weight of 300 grams. In the experiments in the MADD model, all rats will also be weighed prior to the start of the riboflavin deficient diet and consistently once a week in each subsequent week. The discomfort is expected to be mild.

Identification method: Animals will be identified using an indelible mark on the tail. The discomfort is expected to be mild.

Administration of 3-HB dose: administration of the substance will be performed via oral gavage technique. The reason for the use of this administration method is that it allows for standardization of the amount of 3-HB that the rats will receive. This administration method ensures precise and accurate dosing. Furthermore, it mimics the least invasive mode of delivery in humans. All rats will receive only one, single dose of 3-HB. The maximum dose volume will not exceed 10 mL/kg. The discomfort is expected to be mild.

Repetitive blood sampling: Total amount of collected blood will not exceed 10% of the total blood volume

of the rat. The first blood samples will be collected via a small cut in the lateral tail vein. Subsequent serial blood samples will be obtained by gently removing the scab without performing an additional cut. If necessary, sample collection will be facilitated by applying gently pressure proximal to the collection site to occlude venous return. The discomfort is expected to be mild.

Termination: at the end of the experiment, the rats will be euthanized by cervical dislocation after being anaesthetized deeply with the inhalation anaesthetic isoflurane. A terminal bleed will be collected via cardiac puncture before sacrifice. The discomfort is expected to be mild.

Riboflavin deficient diet: all rats included in the experiments in a MADD model will receive a riboflavin deficient diet prior to the experiment in order to induce riboflavin deficiency. The modified diet will be continued during the experiment. The discomfort is expected to be moderate.

For all rats included in experiment A, B & C in the healthy rat model, the total level of discomfort is expected to be mild. For all rats included in experiment A, B & C in the MADD rat model, the total level of discomfort is expected to be moderate due to the dietary induced riboflavin deficiency. Estimated levels of discomfort for the remaining animal procedures in these experiments are the same as in the experiments in the healthy rat model.

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.

Animals in all experiments will be killed in the context of the experiment. If possible, depending on the established t_{max} , animal tissues of an animal group of experiment A will be further analyzed according to standard procedures of experiment B, to already form one of the two additional time point groups of experiment B. Therefore, tissue samples will also be collected in experiment A to enable further analysis in the context of possible sample size reduction. Moreover, the half-life of 3-HB in rats is unknown. Re-using the animals of experiment A for subsequent experiments may lead to incorrectly interpreted results as the half-life of 3-HB and duration of substrate presence in the tissues is unknown.

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

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: [REDACTED]
2. Titel van het project: **Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats**
3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedings supplement 3-HB**
4. Type aanvraag:
X nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: [REDACTED]
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **01-06-2017**
 - aanvraag compleet: **01-06-2017**
 - in vergadering besproken: **08-06-2017**
 - anderszins behandeld: **14-06-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **09-06-2017 tot 14-06-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **14-06-2017**
 - advies aan CCD: **20-06-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: **09-06-2017**
 - Gestelde vraag/vragen:

1/ In de bijlage onder 2A geeft u aan dat één van de onderzoeksvragen is "What are the pharmacokinetic parameters after a single, oral dose of 3-HB in terms of peak plasma concentration (C_{max}), time to reach the C_{max} (t_{max}) and the elimination half-life (t_{1/2})?". De herhaalde bloedmonstername na de eenmalige orale toediening van een ketonlichaam in fase A zou in het kader van de farmacokinetiek moeten kunnen leiden tot vaststelling van de eliminatie t_{1/2} van het betreffende

ketonlichaam. Kun U nader toelichten wat bedoeld wordt met de suggestie dat u 9 dieren extra nodig zou hebben ter bepaling van de $t_{1/2}$ van het betreffende ketonlichaam, zoals aangegeven onder vermindering en de vermelding dat "the half-life of 3-HB in rats is unknown", zoals aangegeven onder L. wijze van doden?

2/ Kunt u toelichten waarom U een relatief hoge power van 0,9 hanteert?

3/ Onder vervanging geeft u aan dat "We are interested in the pharmacokinetic parameters of 3-HB and tissue deposition of 3-HB mixtures rather than the therapeutic effects." Kunt U dit toelichten?

4/ U voorziet gebruik van een diermodel (riboflavin deficient rats, an animal model for MADD) nog niet in zwang in [REDACTED]. Bij welke (relatieve) waarde c.q. effect size van de "activation coefficient of erythrocyte GR" acht u dit diermodel niet valide voor uw onderzoek en ziet u dit mogelijk als go/no go moment?

Datum antwoord: 14-06-2017

Verstrekt(e) antwoord(en):

1. Dat klopt. Na het uitvoeren van de experimenten kan de 3-HB halfwaardetijd worden berekend.

1a Met de 9 extra dieren die onder "2.D – sectie vermindering" worden genoemd wordt bedoeld dat, indien experiment A middels een Latijns vierkant wordt uitgevoerd, de halfwaardetijd van tevoren dient te worden bepaald om de minimale wash out periode te bepalen. Wij hebben echter na zorgvuldige overwegingen, zoals beschreven in de projectbijlage onder "2.D – sectie vermindering", afgezien van het gebruik van een Latijns vierkant. Van het gebruik van deze additionele 9 dieren voor het bepalen van de halfwaardetijd voorafgaande aan het experiment is dan ook geen sprake.

1b Tot op heden is de halfwaardetijd van 3-HB onbekend. Na het uitvoeren van de experimenten kan de 3-HB halfwaardetijd worden berekend. Het hergebruiken van dieren uit experiment A is daarom niet mogelijk omdat het kan leiden tot incorrecte interpretatie van de resultaten. Het gebruik van een Latijns vierkant zou eventueel wel mogelijk worden door van tevoren de 3-HB halfwaardetijd te bepalen (waarvoor tenminste de hierboven genoemde 9 extra dieren nodig zijn). Echter hebben wij hier zoals eerder benoemd na zorgvuldige overwegingen van afgezien.

2. In ons laboratorium wordt algeheel een power van 0,9 gehanteerd. Aangezien het hier een nieuw model betreft, zal pas na de eerste studies duidelijk worden of er eventueel met een lagere power gewerkt kan worden en of er toch compensatie nodig is voor mogelijke uitval. Na experiment A zal een nieuwe poweranalyse worden uitgevoerd gebaseerd op de variatie coëfficiënt en effect size uit de verkregen resultaten met een eventueel aangepaste power om te kijken of het aantal dieren per groep moet worden aangepast.

Betreffende alinea projectbijlage 2.A – oud

Therefore, 288 rats in total will be included in this experiment. No additional rats will be enrolled as no drop-out due to the short duration of the experiments is expected. After experiment A, a new power analysis will be performed based on the VC and effect size in this experiment to evaluate whether the number of animals per group in experiment B & C should be adapted.

Betreffende alinea projectbijlage 2.A – nieuw

Therefore, 288 rats in total will be included in this experiment. No additional rats will be enrolled as no drop-out due to the short duration of the experiments is expected. After experiment A, a new power analysis will be performed based on the VC and effect size in this experiment and possibly an adapted power to evaluate whether the number of animals per group in experiment B & C should be adapted.

3. Hoewel het ratten model voor MADD middels dieet geïnduceerde riboflavine deficiëntie wel de biochemische en metabole status van MADD patiënten nabootst veroorzaakt door een verminderde vetzuuroxidatie activiteit, tonen de ratten geen ernstige (neonatale) ziektesymptomen vergelijkbaar met de symptomen van ernstig aangedane MADD patiënten. Een genetisch gemodificeerd MADD model in ratten bestaat niet. Aangezien we geïnteresseerd zijn in het werkingsmechanisme van 3-HB suppletie en niet de therapeutische effecten ervan, kan dieet geïnduceerde riboflavine deficiëntie als een alternatief rattenmodel voor MADD worden gebruikt om te onderzoeken of de activiteit van het metabolisme de uitkomstparameters beïnvloeden.

4. Een EGRAC status van $\geq 1,3$ wordt aangehouden als afkappunt voor riboflavine deficiëntie en dus een valide ratten model voor MADD. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7e editie]

Betreffende alinea projectvoorstel 3.4.3 - oud

The experiments in the MADD rat model will only be performed after completion of the experiments in healthy rats. A go/no-go criteria for the start of the experiments in the MADD rat model is confirmation of dietary induced riboflavin deficiency through the activation coefficient of erythrocyte glutathione

reductase (EGRAC) [Prentice 1981, Olpin 1982]. An EGRAC status of ≥ 1.3 will be considered as proven riboflavin deficiency. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7e edition]

If at any point during the experiments, administration of 3-HB to the rats is proven to be toxic and results in death of the animal or non-acceptable side effects, possible causes will be investigated thoroughly. The causative factor (for example high 3-HB dose) will be excluded from all subsequent experiments. Only if the 3-HB supplementation is well tolerated by the animals, the experiment will be continued with the next step.

Betreffende alinea projectvoorstel 3.4.3 - nieuw

The experiments in the MADD rat model will only be performed after completion of the experiments in healthy rats. A go/no-go criteria for the start of the experiments in the MADD rat model is confirmation of dietary induced riboflavin deficiency through the activation coefficient of erythrocyte glutathione reductase (EGRAC) [Prentice 1981, Olpin 1982]. An EGRAC status of ≥ 1.3 will be considered as proven riboflavin deficiency. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7e edition]

If at any point during the experiments, administration of 3-HB to the rats or the dietary inducement of riboflavin deficiency is proven to be toxic or harmful and results in death of the animal or non-acceptable side effects, possible causes will be investigated thoroughly. The causative factor (for example high 3-HB dose) will be excluded from all subsequent experiments. Only if the 3-HB supplementation is well tolerated by the animals, the experiment will be continued with the next step.

Betreffende alinea projectbijlage 2.D – oud

The animals included in the MADD model will receive a riboflavin deficient diet prior to the start and throughout the experiment. The biochemical status of riboflavin deficiency will be achieved within approximately six weeks. [Prentice 1981, Olpin 1982, Liao 1987, Ross 1987, Patterson 1988] This will be confirmed by analysis of the activation coefficient of erythrocyte GR (EGRAC) in washed erythrocyte preparations [Prentice 1981, Olpin 1982] isolated from a control blood sample (200 μ L) collected one to two days before the start of the experiment in order to allow for sufficient recovery time from this blood draw. Other relevant metabolites which can be used to improve characterization of the model will also be measured such as acylcarnitines, organic acids, amino acids, acetoacetate, lactate and electrolytes.

Betreffende alinea projectbijlage 2.D – nieuw

The animals included in the MADD model will receive a riboflavin deficient diet prior to the start and throughout the experiment. The biochemical status of riboflavin deficiency will be achieved within approximately six weeks. [Prentice 1981, Olpin 1982, Liao 1987, Ross 1987, Patterson 1988] This will be confirmed by analysis of the activation coefficient of erythrocyte glutathione reductase (EGRAC) in washed erythrocyte preparations [Prentice 1981, Olpin 1982] isolated from a control blood sample (200 μ L) collected one to two days before the start of the experiment in order to allow for sufficient recovery time from this blood draw. An EGRAC status of ≥ 1.3 will be considered as proven riboflavin deficiency. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7e edition] Other relevant metabolites which can be used to improve characterization of the model will also be measured such as acylcarnitines, organic acids, amino acids, acetoacetate, lactate and elektrolytes.

- **De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag**

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

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

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.

NEE

C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag heeft concrete doelstellingen en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC 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 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 de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RUG 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.

De doel categorieën sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

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 is om om meer inzicht te krijgen in mogelijkheden van 3-HB supplementatie door de werkzaamheid van verschillende mixen van 3-HB te onderzoeken, dit met specifieke aandacht voor farmacokinetische parameters en werkingsmechanismen.

Het uiteindelijke doel is om 3-HB supplementatie meer bij MADD-patiënten toe te (kunnen) passen als wel mogelijk ook bij patiënten met een andere 'inborn error of metabolisme' tesamen met een klinische presentatie veroorzaakt door de energie metabolisme deficiëntie.

Er is deels een directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel: 3-HB zal toegepast kunnen worden bij mensen. Het project betreft een fundamenteel en translationeel onderzoek m.b.t. het hiervoor beschreven directe doel; het uiteindelijke doel zal binnen de looptijd van het project naar alle waarschijnlijkheid niet gehaald worden. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd 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 project zijn proefdieren en patiënten met 'inborn error of metabolisme' tesamen met een klinische presentatie veroorzaakt door de energie metabolisme deficiëntie.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan.

Waarden die voor patiënten bevorderd kunnen worden: de 3-HB supplementatie zou een belangrijke behandeling kunnen vormen om energie balans herstel bij patiënten te bevorderen.

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 de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RUG 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 kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat [REDACTED]

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 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. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstellingen 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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **NVT**
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 aanvragers hebben aangegeven dat er afgeweken wordt van de eisen conform bijlage III van richtlijn 2010/63/EU: de dieren in de 'MADD rat model group' zullen voor en gedurende het experiment een riboflavine deficiënt dieet krijgen. De aanvragers hebben de noodzaak hiervoor in voldoende mate onderbouwd.

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*).

Dit lijkt realistisch ingeschat. De DEC 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 dier wordt aangetast door narcose, herhaalde bloedmonstername, gavage en het verstrekken van een riboflavine-deficiënt rantsoen en opoffering.

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 zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig

aangegeven 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 aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De farmacokinetiek en weefselverdeling van 3-HB is niet na te bootsen in vitro.

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 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, zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties.

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 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. Dit blijkt bijvoorbeeld uit het feit dat de aanvrager de status van vetzuuroxidatie gaat monitoren.

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 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*).

In de onderhavige projectaanvraag worden mannelijke dieren gebruikt. Dit is voldoende beargumenteerd door de aanvrager.

Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden

daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

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 is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager. Dieren worden gedood in het kader van de proef (gebruik weefsels, etc.).

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. **NVT**

NTS

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

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging.

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "**Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedingssupplement 3-HB**", dat gericht is op de verbetering van de behandelmethoden van de ziekte MADD en daarmee de vergroting van de kans op herstel bij dergelijke patiënten het gebruik van ratten in een experiment met licht-matig ongerief in de onderhavige aanvraag?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **licht-matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **mogelijk reëel voordeel.**

Algemeen: **vergroting van medische kennis met betrekking tot de behandeling van MADD. Dit kan op termijn leiden tot een verbeterde levensverwachting bij patiënten met deze chronische ziekte.**

De DEC-RUG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "**Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedingssupplement 3-HB**" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven in een experiment tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun levensduur geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden voorafgaand aan de narcose op basis van herhaalde meting lichaamsgewicht en bloedmonstername, gavage en het verstrekken van een riboflavine-deficiënt rantsoen.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het behandelen van MADD als chronische ziekte. Voor de betreffende patiënten is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op herstel van groot belang. Dit verhoogt hun levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven. Tevens zal de kwaliteit van leven van hun naasten verbeterd worden.

Vandaar dat de DEC-RUG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk, translationeel als vanuit maatschappelijk oogpunt, van belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

De DEC-RUG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project "**Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedings-supplement 3-HB**", dat gericht is op de verbetering van de behandeling van MADD, in relatie tot de opoffering van de dieren in het voorliggende project bevestigend.

Hoewel de DEC-RUG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het belang van dit project naar haar mening zwaarder. De DEC-RUG is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie. In de gekozen strategie wordt op voldoende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-RUG 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. De DEC-RUG 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-RUG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "**Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedings-supplement 3-HB**" als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RUG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarde:

- **Dat een 'activation coefficient of erythrocyte glutathione reductase' (EGRAC) waarde bij de riboflavine-deficiënte dieren onder de 1.3 (*) wordt beschouwd als een 'no go' moment.**

() De EGRAC waarde is de ratio van flavin-adenine dinucleotide (FAD)-gestimuleerde enzym activiteit in verhouding tot de niet gestimuleerde enzym activiteit: het geeft de riboflavine status aan. Een EGRAC status van ≥ 1.3 wordt gezien als een bewezen riboflavine deficiëntie.*

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

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

N.v.t. De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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




Bijlagen

2

Datum 22 juni 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 20 juni 2017. Het gaat om uw project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is . 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:

22 juni 2017

Aanvraagnummer:

████████████████████

Datum:
22 juni 2017
Aanvraagnummer:
[REDACTED]

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: [REDACTED]
Naam instelling of organisatie: [REDACTED]
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: [REDACTED]
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
22 juni 2017
Aanvraagnummer:
[REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 september 2017
Geplande einddatum: 1 september 2022
Titel project: Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedingssupplement 3-HB
Naam DEC: [REDACTED]
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

[Redacted]

Datum:

22 juni 2017

Aanvraagnummer:

[Redacted]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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

Bijlagen

2

Datum 22 juni 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 22 juni 2017
Vervaldatum: 22 juli 2017
Factuurnummer: 172265

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1050020172265	€ 1035,-

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

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 24 augustus 2017 11:14
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: FW: aanvraag [REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 11 juli 2017 16:38
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvraag [REDACTED]

Geachte [REDACTED]
Op 20 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" met aanvraagnummer [REDACTED]

U vraagt een vergunning aan met een looptijd van 5 jaar voor een beperkt aantal experimenten. Zou u een meer reële looptijd kunnen aangeven en hiervoor een nieuw aanvraagformulier in kunnen dienen?

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,

[REDACTED]
Medewerker behandelen en ontwikkelen
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

[Redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 24 augustus 2017 11:13
Aan: [Redacted]
Onderwerp: FW: aanvraag [Redacted]

Van: [Redacted]
Verzonden: dinsdag 18 juli 2017 21:41
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [Redacted]
Onderwerp: RE: aanvraag [Redacted]

Geachte heer/mevrouw,

Op 11 juli 2017 jongstleden ontvingen wij van u onderstaande vraag over onze projectaanvraag getiteld "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" (aanvraagnummer [Redacted]). Deze vraag heeft betrekking tot de geplande looptijd van het project.

Tijdens telefonisch contact met [Redacted] heb ik vanmiddag afgesproken dat wij de voorgestelde looptijd van 5 jaar per e-mail zouden toelichten.

[Redacted]

Ik hoop de voorgestelde looptijd hiermee voldoende te hebben toegelicht. We staan uiteraard tot uw beschikking voor het beantwoorden van eventuele aanvullende vragen.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

[Redacted]

Phone: [redacted]
Fax: [redacted]
E-mail: [redacted]
URL: [redacted]

Van: [redacted]
Verzonden: donderdag 13 juli 2017 10:17
Aan: [redacted]
Onderwerp: FW: aanvraag [redacted]

From: **Info-zbo** <info@zbo-ccd.nl>

Date: 2017-07-11 16:38 GMT+02:00
Subject: aanvraag [redacted]
To: [redacted]
Cc: [redacted]

Geachte [redacted]
Op 20 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" met aanvraagnummer [redacted]

U vraagt een vergunning aan met een looptijd van 5 jaar voor een beperkt aantal experimenten. Zou u een meer reële looptijd kunnen aangeven en hiervoor een nieuw aanvraagformulier in kunnen dienen?

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,

[redacted]
Medewerker behandelen en ontwikkelen
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

--
[redacted]
[redacted]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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**

Bijlagen

1

Datum 20 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 20 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium-D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" met aanvraagnummer . Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 18 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u de benodigde looptijd voor het project onderbouwd.

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.

In uw aanvraag wordt niet gesproken over kinetisch modelleren, de mogelijkheid hiervoor in dit specifieke geval is mogelijk niet eenvoudig. Wij willen uw aandacht vragen om de in dit project gemeten resultaten in de toekomst te gebruiken voor kinetische modelleringen.

U kunt met uw project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022. Deze termijn is anders dan in uw

aanvraag, omdat een vergunning een maximale looptijd van 5 jaar kan hebben.

Datum:
20 juli 2017
Aanvraagnummer:
[REDACTED]

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RuG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 20 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij niet geheel over.

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:



Algemeen Secretaris

Datum:
20 juli 2017
Aanvraagnummer:
[Redacted]

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:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium-D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" met aanvraagnummer [REDACTED], volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RuG. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. De door de DEC gestelde voorwaarde wordt niet overgenomen, daar deze handelswijze al in de projectaanvraag beschreven staat. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 20 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 20 juni 2017, ontvangen op 20 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 18 juli 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Pharmacokinetics parameters and 3-HB deposition in organ tissues after supplementation of various 3-HB mixtures				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar	288	50% Matig 50% 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.

Aanvraagnummer:



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:
[REDACTED]

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 onvereenigbaar 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:



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.