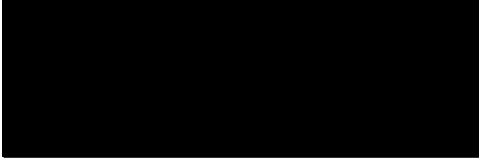




> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

**Onze referentie**  
B.2.16.028

**Uw referentie**  
[REDACTED]

**Briefkenmerk**  
CCD-2017-128

**Bijlage(n)**  
1

Datum **04 MEI 2017**  
Betreft Beslissing op bezwaar B.2.16.028 (W16-13S)

Geachte heer [REDACTED],

Bij brief van 4 oktober 2016, ontvangen op 5 oktober 2016, heeft u, namens uw cliënte mevrouw [REDACTED], een bezwaarschrift (met kenmerk 2016/155) ingediend tegen het besluit van de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) van 1 september 2016 met kenmerk W16-13S.

**Verloop van de procedure**

Op 10 mei 2016 ontvingen wij per e-mail het verzoek op basis van de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) van uw cliënte om toezending van documenten die betrekking hebben op een zevental verschillende vergunningen. Voor een opsomming van de vergunningen wordt verwezen naar het verzoek. Bij besluit van 1 september 2016 is op dit Wob-verzoek beslist.

Op 13 oktober 2016 hebben wij per brief bevestigd dat wij uw bezwaarschrift hebben ontvangen.

Middels de reactie van 19 oktober 2016 op uw klachtbrief van 5 oktober 2016 is aangegeven dat de documenten op korte termijn op de website van de CCD zouden worden geplaatst. Dit is aldus op 31 oktober 2016 geschied.

Vervolgens is bij brief van 21 november 2016 aan u medegedeeld dat de termijn om te beslissen op het bezwaarschrift met zes weken is verdaagd.

Op 14 maart 2017 ontvingen wij – via de rechtbank Gelderland – van u een beroepschrift wegens het niet tijdig beslissen op het betreffende bezwaarschrift.

Op 16 maart 2017 hebben wij u verzocht om uw gronden van bezwaar (eventueel) aan te vullen, nu de documenten van het bestreden Wob-besluit W16-13S sinds 31 oktober 2016 op de website van de CCD staan gepubliceerd. Tevens hebben wij ruim voor de datum van de hoorzitting de geanonimiseerde zienswijzen van derde belanghebbenden toegestuurd. Wij hebben u voor de aanvulling van de gronden een termijn tot 30 maart 2017 verleend. Van deze mogelijkheid heeft u geen gebruik gemaakt.

Voorts heeft op 4 april 2017 de hoorzitting met u plaatsgevonden. Het verslag van de hoorzitting is als bijlage bij dit besluit gevoegd. Tijdens de hoorzitting heeft u een groot aantal nieuwe bezwaargronden aangevoerd. Gesteld wordt dat met het zodanig laat kenbaar maken van nieuwe gronden van bezwaar derde belanghebbenden worden belemmerd om daarop adequaat te reageren, waardoor de goede voortgang van de procedure is belemmerd. Uw handelswijze wekt bovendien op zijn minst de indruk dat deze is bedoeld om de besluitvorming te vertragen, zodat een dwangsom wordt verbeurd, nu u onlangs een beroep niet tijdig beslissen heeft ingediend.

Derde belanghebbenden hebben aangegeven niet gehoord te willen worden in deze zaak.

#### **Beslissing**

Het bestuur van de CCD verklaart het bezwaar namens uw cliënte gedeeltelijk gegrond.

Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen het bestuur van de CCD tot deze beslissing is gekomen.

#### **Ten aanzien van de ontvankelijkheid**

Het bezwaar richt zich tegen het besluit van 1 september 2016. Het bezwaarschrift is ingediend binnen zes weken na bekendmaking van het besluit. Het bezwaar is derhalve tijdig ingediend. Voldaan is ook aan de overige door de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb) gestelde eisen, zodat het bezwaarschrift ontvankelijk is.

#### **Derde belanghebbenden**

De derde belanghebbenden zijn gevraagd om een zienswijze. Deze zienswijzen zijn u voor de hoorzitting, anoniem, verbonden aan het NTS-nummer, verstrekt.

#### **Bezwaren**

Hieronder worden uw bezwaargronden kort toegelicht.

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

Daarnaast heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn



gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt (hierna: **bezwaar 3**). Tevens maakt u bezwaar tegen het feit dat informatie wordt geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob en dat dit wordt gemotiveerd door te verwijzen naar dierenrechtenactivisme (hierna: **bezwaar 4**).

Tijdens de hoorzitting heeft u aanvullend nog een aantal gronden van bezwaar genoemd. Twee vergunningen, 2016445 en 2016451, zijn geen voorwerp van discussie. In de overige vijf vergunningen is de onderzoeksopzet geweigerd, maar wordt bestreden dat die herleidbaar is tot personen. In vergunning 2016427 zijn alle referenties geweigerd, maar betwist u dat alle referenties naar de betrokken onderzoekers leiden. In dezelfde vergunning wordt in de aanvraag de mate van ongerief geweigerd, maar dit is niet herleidbaar tot personen en bovendien wel essentiële informatie met betrekking tot de vergunning. In dezelfde vergunning is voorts de ethische afweging in het DEC-advies onterecht geweigerd. In vergunning 2016457 zijn aantallen dieren, groepen en de overlevingstijden van de dieren geweigerd, maar dit is niet op een juiste weigeringsgrond gebeurd. Deze gronden zullen tezamen met **bezwaar 3** worden behandeld.

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

#### **Ten aanzien van bezwaar 1**

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

Tijdens de hoorzitting op 4 april 2017 heeft u aangegeven dat het onderhavige Wob-verzoek ziet op de correspondentie tussen de DEC's en de CCD en de aanvragers en de CCD. Hiermee heeft u het Wob-verzoek ingeperkt, waardoor de bovenstaande bezwaargrond komt te vervallen.

Aanvullend kunnen wij aangeven dat de data van vergaderingen onderdeel uitmaken van het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD. Het complete document is geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob. Data van vergaderingen van de CCD kunnen echter niet worden gezien als persoonlijke beleidsopvattingen ten behoeve van intern beraad. De data van vergaderingen worden middels dit besluit alsnog niet geopenbaard, omdat de data reeds openbaar zijn middels de verslagen van de vergaderingen van de CCD. Deze verslagen zijn eenvoudig te vinden op de website van de CCD. Deze verslagen zijn eenvoudig te vinden op de website van de CCD, via (onder andere) de zoekterm 'verslag'.

Op basis van het vorenstaande slaagt deze grond.

#### **Ten aanzien van bezwaar 2**

Bij het besluit zijn per vergunning kruisjestabellen toegevoegd. In deze tabellen staan de aangetroffen documenten naar aanleiding van het Wob verzoek. De

documenten zijn genummerd en per document is opgenomen welke, indien van toepassing, weigeringsgrond(en) zijn toegepast.

Uit vaste jurisprudentie volgt dat op deze wijze voldoende inzichtelijk is gemaakt op welke grond(en) informatie wordt geweigerd. Verwezen wordt naar onder meer de uitspraak van de rechtbank Amsterdam van 29 december 2016, ECLI:NL:RBAMS:2016:9336.

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

Bij enkele in het besluit genoemde documenten is informatie geweigerd op alleen de weigeringsgrond onevenredige benadeling. Ook dit volgt uit het besluit.

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

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

Op basis van het vorenstaande slaagt deze grond niet.

### **Ten aanzien van bezwaar 3**

In uw bezwaarschrift heeft u aangegeven dat wegeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn gemaakt. Aangegeven wordt wat derde belanghebbenden in hun zienswijzen hebben gesteld, maar door de CCD wordt hierop niet beslist.

Tijdens de hoorzitting heeft u voorts aangegeven dat in de vergunningen 2016426, 2016447 en 2016454 de onderzoeksopzet is geweigerd, maar dat wordt bestreden dat dit herleidbaar is tot personen. Ten aanzien van de vergunningen 2016445 en 2016451 bestaat volgens u geen discussie. In vergunning 2016427 zijn alle referenties geweigerd, maar u betwist dat alle referenties naar de betrokken onderzoekers leiden. Ook wordt de mate van ongerief geweigerd, maar dit is niet herleidbaar tot personen en volgens u bovendien essentiële informatie met betrekking tot de vergunning. Daarnaast is in deze vergunning de ethische afweging in het DEC-advies volgens u ten onrechte geweigerd. In vergunning



2016457 zijn aantallen dieren, groepen en de overlevingstijden van de dieren geweigerd, maar dit is naar uw mening niet op een juiste weigeringsgrond gebeurd.

U kunt zich vinden in het weigeren van referenties naar onderzoekers die ook bij dit onderzoek betrokken zijn.

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

Voor wat betreft vergunning 2016426 is in de bijbehorende inventaris aangegeven dat in de documenten 1, 2, 5, 6, 8 en 9 gegevens zijn geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Behoudens document 2 betreft het hier namen, locatiegegevens, gegevens die herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. De CCD is van mening dat deze gegevens terecht zijn geweigerd. In document 2 gaat het om een combinatie van (een deel van) voornoemde gegevens, referenties en de naam van de financier van het onderzoek.

De CCD is van oordeel dat de gegevens op pagina 7 (document 2) geweigerd dienen te blijven, omdat dit informatie betreft die leidt naar de betrokken onderzoekers. De CCD acht het niet wenselijk dat gegevens over onderzoekers openbaar worden gemaakt. Ditzelfde geldt voor enkele gegevens bovenaan pagina 11 (document 2). Het gaat hier om locatiegegevens van locaties waar dierproeven worden uitgevoerd. De namen van financiers van het onderzoek op pagina 11 (document 2) worden middels dit besluit alsnog geopenbaard.

In de vergunning 2016427 zijn in document 2 en 3 alle referenties geweigerd, omdat deze leiden naar de betrokken onderzoekers. Uit navraag bij de betrokken vergunninghouder is gebleken dat het deels om referenties van onderzoekers betrokken bij de vergunning gaat en deels om referenties van leden van de onderzoeksgroep. Gezien de grootte van de onderzoeksgroep acht de CCD het aannemelijk dat alle referenties naar de betrokken onderzoekers dan wel naar leden van de betreffende onderzoeksgroep leiden. Tijdens de hoorzitting heeft u aangegeven dat u zich kunt vinden in de weigering van referenties die naar betrokken onderzoekers verwijzen. De geweigerde referenties blijven ook middels dit besluit geweigerd.

Daarnaast heeft u tijdens de hoorzitting aangegeven dat informatie in document 4 en 5 onder "K" en in document 6 en 8 onder "D" ten onrechte is geweigerd, omdat dit niet herleidbaar is tot personen en bovendien wel essentiële informatie met betrekking tot de vergunning is.

De genoemde informatie is in het bestreden besluit geweigerd, vanwege het zijn van concurrentiegevoelige informatie (en niet vanwege herleidbaarheid). De informatie onder "K" in de documenten 4 en 5 betreft informatie over de mate van ongerief. In de eerste zin van dit onderdeel wordt aangegeven welke classificaties van ongerief aan de orde zijn. Vervolgens wordt per handeling de mate van ongerief beschreven. De mate van ongerief per handeling dient echter niet

geweigerd te worden, maar slechts de tekst die ervoor, dan wel erna, staat. Middels dit besluit zullen deze classificaties van ongerief alsnog worden geopenbaard.

De informatie onder "D" in de documenten 6 en 8 betreft het onderdeel 'ethische afweging'. Een gedeelte van de geweigerde informatie – te weten de eerste alinea – is echter eveneens in de reeds openbare niet-technische samenvatting weergegeven. Middels dit besluit zal de eerste alinea van "D ethische afweging" worden geopenbaard. In de tweede alinea van dit onderdeel wordt niet de ethische afweging beschreven, maar worden specifieke delen van de onderzoeksopzet genoemd. Dit betreffen specifieke termen en nog te onderzoeken effecten. De CCD is van oordeel dat de vergunninghouder voldoende inzichtelijk heeft gemaakt dat deze gegevens concurrentiegevoelige gegevens betreffen, welke in deze fase van het onderzoek nog niet geopenbaard dienen te worden. De daadwerkelijke ethische afweging is in dit onderdeel geopenbaard.

In de vergunningen 2016445 en 2016451 is weliswaar informatie geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob, maar zoals uit zowel het besluit als de documenten volgt, gaat het hier slechts om namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. Dit geldt ook voor document 6 van vergunning 2016451, waarin slechts één naam is geweigerd. De CCD is van oordeel dat deze gegevens terecht niet zijn geopenbaard vanwege het belang van het beschermen van de persoonlijke levenssfeer en het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling. Dit volgt uit zowel de gronden opgenomen in het bestreden besluit als uit de gronden die elders in dit besluit zijn opgenomen.

Uit het besluit en de documenten volgt dat voor wat betreft vergunning 2016447 in de documenten 1, 2, 4, 5, 6, 7, 10 en 11 informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. In de documenten 1, 5, 6, 7, 10 en 11 betreft dit namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. De CCD blijft bij het standpunt dat deze gegevens terecht zijn geweigerd, zoals reeds elders in het besluit is gemotiveerd.

Op pagina 11 (document 2) zijn namen van financiers van het onderzoek en namen van samenwerkende instanties geweigerd. Op pagina 14 (document 2) zijn de namen van samenwerkende instanties en enkele referenties geweigerd. De CCD is van oordeel dat referenties terecht zijn geweigerd, aangezien de referenties direct leiden tot onderzoekers die ook bij dit onderzoek zijn betrokken. De vergunninghouder heeft de namen doorgegeven van de onderzoekers wie het betreft en deze namen komen overeen met de namen in de referenties.

De naam van de instantie waarmee door de vergunninghouder wordt samengewerkt wordt geweigerd. Aanvullend aan het bestreden besluit stelt de CCD dat de Raad van State geen aanleiding heeft gezien om namen openbaar te maken, waarmee een vergunninghouder in een bepaald onderzoek samenwerkt. Verwezen wordt naar de uitspraak van de Raad van State van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952). In de documenten zal worden verduidelijkt waar het gaat om samenwerkingen.



Hetzelfde geldt voor de namen van financiers van het onderzoek. Via een zoekopdracht op de website van deze financiers is eenvoudig te achterhalen welke onderzoekers bij dit onderzoek zijn betrokken. Het feit dat deze informatie al in een andere vorm is gepubliceerd brengt niet zonder meer mee dat gegevens in een Wob-procedure niet meer kunnen worden geweigerd. Met name de context waarbinnen de informatie wordt geopenbaard is van belang. Bovendien omvat de onderzoeksopzet meer (specifieke) informatie over het onderzoek dan hetgeen op een website is gepubliceerd.

Voorts is op pagina 21 (document 4) de naam van een instituut van de vergunninghouder geweigerd, vanwege de herleidbaarheid naar de betrokken onderzoekers. De naam van het instituut in combinatie met de overige (openbare) informatie leidt eenvoudig tot de naam van de betrokken onderzoekers. De CCD is van oordeel dat de naam van het instituut derhalve geweigerd dient te blijven.

Voor wat betreft vergunning 2016454 volgt uit zowel het besluit als de bijbehorende inventaris dat informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. In de documenten 1, 5, 6, 8 en 9 betreft het namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. De CCD is van oordeel dat deze gegevens terecht zijn geweigerd op grond van hetgeen in het bestreden besluit is aangegeven.

In document 2, om precies te zijn op pagina 8, 10 en 11 van het geheel is een specifieke term en daaraan gerelateerde informatie geweigerd, vanwege de concurrentiegevoeligheid. De CCD is van oordeel dat de vergunninghouder voldoende inzichtelijk heeft gemaakt dat in dit document concurrentiegevoelige gegevens staan, waarbij openbaarmaking leidt tot onevenredige benadeling van de vergunninghouder ten opzichte van concurrenten. Zoals de vergunninghouder in de zienswijze heeft aangegeven, betreft het slechts een bepaalde specifieke term met betrekking tot vaccinatie en daaraan gerelateerde strategische informatie, welke nog niet eerder zijn gebruikt, dan wel zijn geopenbaard. Bovendien leidt deze term – en de daaraan gerelateerde informatie – eenvoudig tot de betrokken onderzoeksgroep.

Op pagina 9 is de naam van een afdeling van een instelling geweigerd, vanwege de herleidbaarheid naar personen. De naam van de afdeling in combinatie met de overige (openbare) informatie leidt eenvoudig tot betrokken onderzoekers die op deze afdeling werkzaam zijn. De CCD acht het niet wenselijk dat een naam van een afdeling wordt geopenbaard die eenvoudig naar de betrokken onderzoekers leidt.

Tenslotte volgt uit het besluit en de bijbehorende documenten dat in vergunning 2016457 informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Op document 2, 4, 5 en 8 na, betreft het hier namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. Deze gegevens zijn naar het oordeel van de CCD terecht geweigerd. De documenten 2, 4, 5 en 8 bevatten naar de mening van de CCD concurrentiegevoelige informatie, waarbij openbaarmaking leidt tot onevenredige benadeling van de vergunninghouder.

Tijdens de hoorzitting heeft u voor wat betreft deze vergunning aangegeven dat aantallen dieren, aantallen groepen en overlevingstijd van dieren ten onrechte worden geweigerd. De CCD wijst erop dat het totaal aantal gebruikte dieren blijkt uit deze documenten en tevens reeds openbaar is middels de niet-technische samenvatting. De CCD acht het echter van belang dat subaantallen en subgroepen in het onderhavige geval niet worden geopenbaard, omdat hieruit impliciet de gevolgde lijn van de onderzoekers blijkt. Het geeft inzicht in de afwegingen van de vergunninghouder op belangrijke punten in het proces. Het gebruikte aantal dieren per groep kan essentieel zijn voor het verdere verloop en de uitkomsten van het onderzoek. De CCD acht het niet wenselijk wanneer reeds in deze fase van het onderzoek informatie met betrekking tot de uitkomsten van het onderzoek worden geopenbaard.

Daarnaast wordt specifieke informatie over namen van producten, gebruikte technieken, soorten hechtingen en tijdsgroepen geweigerd, omdat dit tot in detail inzicht geeft in de werkwijze van de vergunninghouder. De CCD is van oordeel dat deze gegevens – in combinatie met de bovenstaande gegevens – niet geopenbaard dienen te worden. Evenals hiervoor is aangegeven, geven ook deze gegevens inzicht in de afwegingen van de vergunninghouder op belangrijke punten in het onderzoek. Deze informatie is in hoge mate concurrentiegevoelig, omdat concurrenten de informatie kunnen gebruiken voor een eigen onderzoeksstrategie in een identieke of vergelijkbare situatie. Hierbij kan verwezen worden naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811), waaruit volgt dat de beoogde onderzoeksopzet terecht is aangemerkt als concurrentiegevoelige en als gevolg daarvan is geweigerd op grond van het voorkomen van onevenredige benadeling.

De vergunninghouder en de DEC bij deze vergunning hebben in hun zienswijze aangegeven dat de reeds vergaarde informatie wordt verwerkt in een wetenschappelijk artikel dat nog moet worden gepubliceerd. De vergunninghouder en de DEC verwachten dat de publicatie, de te verwachten resultaten en de daaropvolgende publicaties grote impact zullen hebben op de concurrentiepositie van de vergunninghouder. Zij zijn van mening dat het onderzoek uniek is qua opzet en tot baanbrekende inzichten kan leiden.

Uit navraag bij de vergunninghouder is gebleken dat het artikel nog niet is gepubliceerd. De CCD is derhalve van oordeel dat de betreffende informatie niet reeds in deze fase van het onderzoek – en dus voordat de uitkomsten bekend zijn – geopenbaard dient te worden. De CCD acht het van belang voor de vergunninghouder dat zij als eerste naar buiten treedt met de resultaten van het onderzoek en is van mening dat openbaarmaking van de geweigerde informatie de publicatie in gevaar brengt.

Op basis van het voorgaande slaagt deze grond.

#### **Ten aanzien van bezwaar 4**

In uw bezwaarschrift stelt u dat met de weigering op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer (artikel 10 lid 2 sub e van de Wob), vanwege dreiging van dierenrechtenactivisme, wordt voorbij gegaan aan het jaarverslag van de AIVD over 2015, waarin staat dat dierenrechtenextremisme een teruglopend fenomeen is en dat het nu alleen nog vreedzame acties en demonstraties betreft.





U stelt dat de CCD dit niet kan beoordelen en verzoekt de gegevens alsnog openbaar te maken.

In tegenstelling tot deze bezwaargrond is bij de behandeling van het bestreden besluit uitgegaan van het op dat moment beschikbare meest recente AIVD jaarverslag en DTN van de NCTV. In het bezwaarschrift verwijst u slechts naar de voorgaande versies.

In de memorie van toelichting bij de Wet op de Dierproeven (Tweede Kamer, vergaderjaar 2012–2013, 33 692, nr. 3) wordt benadrukt dat ook tot personen herleidbare gegevens onder de weigeringsgrond eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer kunnen vallen. In de memorie van toelichting is aangehaald dat: *“het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaar moet wegen.”* Daarbij speelt een rol dat personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven een maatschappelijke taak uitoefenen en het risico lopen slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme<sup>1</sup>. In het recente verleden zijn daar veel voorbeelden van geweest. Uit vaste rechtspraak volgt dat, dat ook bij de Wob een terugkerend onderwerp is.

Binnen de context van de opgevraagde documenten bestaat de vrees voor gevaar voor de persoonlijke levenssfeer en dat personen betrokken bij dierproeven als gevolg van openbaarmaking van hun gegevens overmatig en mogelijk ook gewelddadig zullen worden benaderd door dierenrechtenactivisten. De incidenten die zich in het verleden hebben voorgedaan bevestigen dat een kleine groep mensen een reëel risico kan vormen en dat de vrees voor acties van dierenrechtenactivisten gerechtvaardigd is. Verwezen wordt naar de uitspraak van de rechtbank Midden-Nederland van 8 augustus 2016, zaaknummers UTR 15/3008 en UTR 15/3727. Dat er nog steeds een reële dreiging van radicaal dierenrechtenactivisme uitgaat, blijkt in de eerste plaats uit de uitspraken van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680) en 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952).

De Afdeling stelt dat het betrokken bestuursorgaan zich in redelijkheid op het standpunt heeft kunnen stellen dat het belang van betrokken derde belanghebbenden om tegen bedreigingen en intimidatie van dierenrechtenactivisten beschermd te blijven en daarmee het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als bedoeld in artikel 10 lid 2 sub g van de Wob zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens. Uit de uitspraken volgt dat het belang van bescherming van werknemers van vergunninghouders, proefdierinstellingen en andere betrokkenen groot is en in de afweging van belangen zwaarder weegt dan het publieke belang van openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

Van belang is verder dat met het openbaar maken van persoonsnamen en tot personen herleidbare gegevens, deze gegevens voor een ieder openbaar zijn en ook openbaar blijven. Dit is benadelend voor de betrokken personen. De CCD zal de namen van personen en alle daar direct of indirect naar herleidbare gegevens blijven weigeren.

---

<sup>1</sup> Biz. 14 Memorie van Toelichting Wet op de dierproeven

De CCD is van oordeel dat de afweging om het wel of niet openbaar maken van persoonsgegevens een geheel andere is dan het weigeren van namen van vergunninghouders. Naar het oordeel van de CCD kan de conclusie van een afweging om informatie met betrekking tot openbaarmaking van bedrijfsnamen van vergunninghouders versus de openbaarmaking van persoonsnamen op basis van een vergelijkbaar feitencomplex van elkaar afwijken. De belangenafweging is van geheel andere aard en kent ook een ander gewicht. De hierboven genoemde overwegingen geven op zijn minst aanleiding een zwaarder gewicht toe te kennen aan de belangen van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

Het belang van weigering van persoonsgegevens en tot persoonsgegevens herleidbare informatie weegt op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaarder dan het publiek belang van openbaar maken van deze informatie.

Op basis van het vorenstaande slaagt deze grond niet.

#### **Verzoek proceskostenvergoeding**

U heeft verzocht om proceskostenvergoeding door toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb. Ingevolge artikel 7:15 lid 2 Awb komen de kosten die de belanghebbende in verband met de behandeling van het gemaakte bezwaar heeft moeten maken voor vergoeding in aanmerking, indien sprake is van een herroeping van het besluit, vanwege een aan het bestuursorgaan te wijten onrechtmatigheid. Gelet op artikel 7:15 lid 2 Awb in samenhang met het Besluit proceskosten bestuursrecht heeft u recht op een vergoeding van € 990,- zijnde 1 punt á € 495,- voor het ingediende bezwaarschrift en 1 punt á € 495,- voor de gehouden hoorzitting.

#### **Wijze van openbaarmaking**

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

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

#### **Beroep**

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



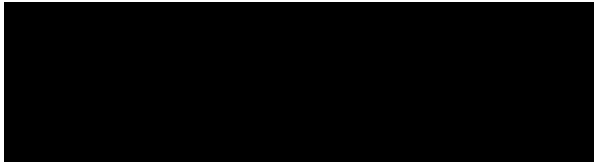
U kunt ook digitaal beroep instellen bij genoemde rechtbank via <http://loket.rechtspraak.nl/bestuursrecht>. Daarvoor dient u wel te beschikken over een elektronische handtekening (DigiD). Kijk op de genoemde site voor de precieze voorwaarden.

**Tot slot**

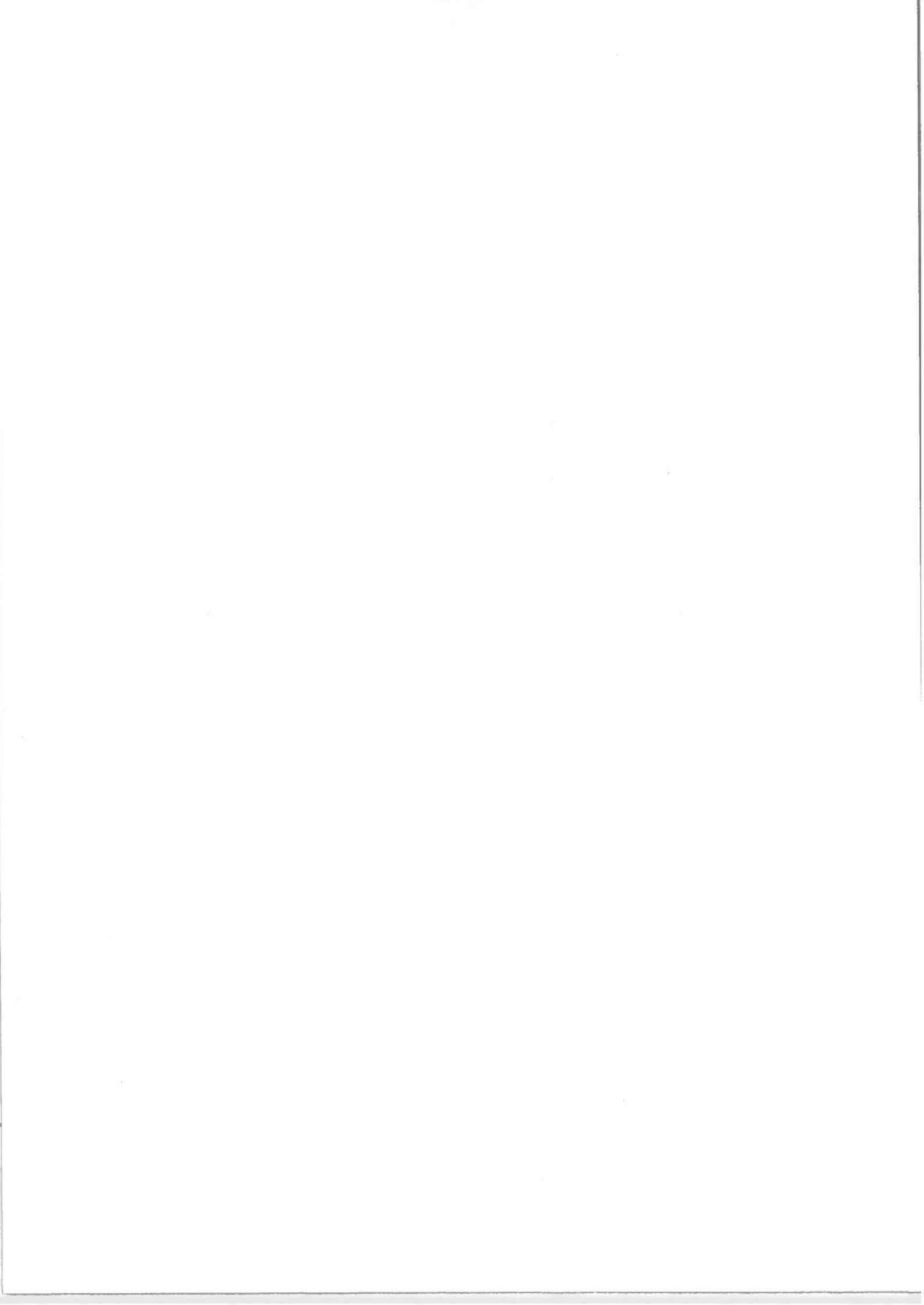
In deze brief is u uitgelegd wat de reden is voor deze beslissing. Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). of neem telefonisch contact met ons op via 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,



Prof. dr. L. Hellebrekers  
Voorzitter



Inventaris Wob-verzoek W16-13S									
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016426</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 en 2			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x	x	
9	Mail terugkoppeling DEC 22-4-2016				x		x	x	

AVD 10300206426

1



18 FEB. 2016

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

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

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters  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 6 . 0 3 . 2 0 1 6
- Einddatum 1 6 . 0 3 . 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Drug development for atopic dermatitis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Geneesmiddelenontwikkeling voor atopisch eczeem
- 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
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.187,00 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, *factuur informatie*

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 16 - 03 - 2016

Handtekening [REDACTED]





**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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

# 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Drug development for atopic dermatitis

# 2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input type="checkbox"/> Basic Research <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use or 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 <input type="checkbox"/> 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.

#### General background

It is a regrettable misconception that skin diseases are merely a 'cosmetical' problem. Inflammatory skin diseases such as atopic dermatitis (AD) are quite prevalent in western societies, and have a large impact on patients and their families. Although considerable progress has been made in understanding the genetics and pathogenesis of these diseases, there is still a large unmet medical need. The most widely used topical drugs are corticosteroids ('hormone' creams) that suppress the immune system and inflammation. Chronic use of corticosteroids is not recommended and many parents are reluctant to give steroids to young children, leading to inadequately controlled eczema.

Based on recent findings by a number of investigators, [REDACTED], there are now a number of pathophysiological pathways known that can be exploited for drug design. Our research programme has identified novel disease targets<sup>1, 2</sup> and this opens the possibility to develop new therapeutics for these targets. [REDACTED]

[REDACTED] The experiments described in this project application aim to translate our finding from genetics and cell biology to two novel drugs that can be applied in AD<sup>3, 4</sup>.

Approaches by the major pharmaceutical industries are aimed at immunological pathways, and many of them are directed at the generation of extremely expensive (and profitable) biologics. We aim primarily for other, skin-specific targets such as skin barrier and skin microbiome<sup>5-7</sup>. In this way, our approach is distinct from that of 'big pharma' and we do not duplicate work that is done elsewhere.

Atopic dermatitis is a heterogeneous disease and not every therapeutic approach will work for any given patient. The availability of a broad array of therapeutic options is desirable to achieve a 'personalized medicine' approach for these patients.

Although we can model many aspects of human disease in vitro using reconstructed skin cultures that we have developed, the proposed research requires the use of experimental animals.

#### Atopic dermatitis

AD is a chronic or chronically relapsing inflammatory skin disease arising from a complex interrelationship of genetic, environmental and immunologic factors.<sup>8</sup> It is characterized by intense itch leading to repeated scratching, redness, scaling, and loss of the skin barrier function. AD is often the first

manifestation of other common atopic diseases, namely allergic rhinitis and asthma (40%–60% of cases), in a phenomenon known as the atopic march. It is one of the most common skin diseases, with worldwide lifetime prevalence cases ranging from 10%–20% in children, and 1%–3% in adults. AD can significantly impact a patient's ability to carry out daily activities and creates immense challenges during the management of the disease.

The current understanding of the pathophysiology of AD now includes the following characteristic features:

- Th2-cytokine involvement in the initiation phase of the disease, which consequently increases IgE production and downregulates skin barrier protein expression
- Skin barrier dysfunction or dry skin, abnormal lipid metabolism and/or epidermal structural protein formation. The latter is due to genetic factors, including filaggrin null alleles as the strongest contributor<sup>9</sup>.
- An abnormal microbial colonization with pathogenic organisms such as *Staphylococcus aureus*, which subsequently increases the patients' susceptibility to skin infection

A number of topical therapies are available for mild to moderate AD, such as corticosteroids, calcineurin inhibitors and coal tar. For severe AD, systemic therapies (ciclosporin, methotrexate) and UVB-irradiation are used, and biologicals are currently under development. Topical therapeutics for patients with mild to moderate disease have their limitations. Long term use of corticosteroids is clearly contra-indicated because of side effects and calcineurin inhibitors are not very effective. Coal tar is very effective but its smell, staining and phototoxicity make it unattractive and reduce patient compliance. In addition, there are safety concerns on coal tar as it contains polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Many dermatologists are abandoning this effective therapy for unsubstantiated reasons. The generation of a coal tar preparation that contains less or no PAH, and has more patient-friendly properties, would be a major innovation and contribution to the topical therapies for AD, particularly in young children.

The skin of AD patients is often colonized by *S.aureus*, and in a subset of patients recurrent *S.aureus* infections pose a significant problem. Long term use of broad-spectrum antibiotics is clearly not an option, but antibiotics and antiseptic treatments, however, are widely used in these patients. As resistance against current topical antibiotics is increasing, the development of narrow-spectrum targeted antibiotics is required for these patients.

It is clear that AD patients are heterogeneous both genetically and clinically. For this reason, personalized therapeutic strategies are required that target specific pathways of the disease such as the immune system, the skin barrier and the microbial component. Development of drugs that strengthen the skin barrier or correct the skin microbiome has not been a priority of pharmaceutical industry so far. Based on our previous fundamental research we have developed drug candidates for preclinical work on these two aspects of the disease. We believe that this might lead to valuable new therapies in the armamentarium for AD.

## **Previous work on drug development**

Here we provide a background for the proposed experiments aiming to develop two novel anti-AD drugs. These two drugs have distinct modes of action and will be applied to subsets of AD patients. They may both replace existing drugs and/or expand the therapeutic options to enable personalized medicine for AD.

### **1. Coal tar as a source of new therapeutics**

Coal tar is one of the oldest dermatological drugs for topical use, and is active both in psoriasis and AD. We have recently elucidated the working mechanism of coal tar at the molecular level<sup>3</sup>. The demonstration that the arylhydrocarbon receptor (AHR) mediates these effects has drawn a lot of

attention and has caused a re-appreciation of the AHR as a bona fide pharmacological target. Coal tar is a smelly substance that stains clothing and contains PAH. For this reason it is gradually abandoned despite its efficacy. We have fractionated coal tar and managed to obtain biologically active preparations with reduced PAH content, that are more patient-friendly (no smell or color). We are currently preparing animal experiments to progress towards clinical development. Coal tar preparations will be used only for topical application. We think that it will be an effective, safe and affordable alternative to topical corticosteroids.

## 2. Pantothenate (vitamin B5) derivatives as novel therapeutics

We have identified members of the vanin gene family as potential drug targets in the skin disease psoriasis<sup>10</sup>. Vanins are involved in the metabolic route of pantothenic acid (vitamin B5), which is a necessary factor in the biosynthesis of Coenzyme A. Specific vanin inhibitors based on analogues of pantetheine were synthesized and lead optimization, yielded a series of novel chemical entities with IC<sub>50</sub> values of 500 nM to 50 mM<sup>11</sup> which showed favourable pharmacokinetics (PK). Chemical modifications of these vanin inhibitors (so-called pantothenamides) were found to have anti-microbial activity in vitro against gram-positive bacteria and malaria parasites<sup>4, 12</sup>. Lead optimization of this compound series yielded antibiotics with very narrow activity profiles against Staphylococci. As *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) is thought to be an important contributing factor in the pathogenesis of AD, and many AD patients suffer from recurrent *S.aureus* infections, we aim to develop these compounds to eliminate *S.aureus* from the skin and other niches of the body (e.g. the nostrils). We will test the anti-*S.aureus* activity of these compounds in models of *S.aureus* colonization/infection and AD-models where *S.aureus* is assumed to play a role. Both topical and systemic use will be investigated. These proposed new small-spectrum antibiotics are positioned to replace current broad spectrum topical antibiotics such as fusidic acid and mupirocin, for which resistance is emerging. When sufficiently potent compounds are obtained, systemic application will be pursued as well.

## References

1. de Cid R, Riveira-Munoz E, Zeeuwen PL, Robarge J, Liao W, Dannhauser EN, Giardina E, Stuart PE, Nair R, Helms C, Escaramis G, Ballana E, Martin-Ezquerria G, den Heijer M, Kamsteeg M, Joosten I, Eichler EE, Lazaro C, Pujol RM, Armengol L, Abecasis G, Elder JT, Novelli G, Armour JA, Kwok PY, Bowcock A, Schalkwijk J, Estivill X. Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. **Nat Genet.** 2009;41(2):211-5.
2. Hollox EJ, Huffmeier U, Zeeuwen PL, Palla R, Lascorz J, Rodijk-Olthuis D, van de Kerkhof PC, Traupe H, de Jongh G, den Heijer M, Reis A, Armour JA, Schalkwijk J. Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. **Nat Genet.** 2008;40(1):23-5.
3. van den Bogaard EH, Bergboer JG, Vonk-Bergers M, van Vlijmen-Willems IM, Hato SV, van der Valk PG, Schroder JM, Joosten I, Zeeuwen PL, Schalkwijk J. Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. **J Clin Invest.** 2013;123(2):917-27.
4. Jansen PA, Hermkens PH, Zeeuwen PL, Botman PN, Blaauw RH, Burghout P, van Galen PM, Mouton JW, Rutjes FP, Schalkwijk J. Combination of pantothenamides with vanin inhibitors as a novel antibiotic strategy against gram-positive bacteria. **Antimicrob Agents Chemother.** 2013;57(10):4794-800.

5. Zeeuwen PL, Boekhorst J, van den Bogaard EH, de Koning HD, van de Kerkhof PM, Saulnier DM, van S, II, van Hijum SA, Kleerebezem M, Schalkwijk J, Timmerman HM. Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption. **Genome Biol.** 2012;13(11):R101.
6. Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, Nomicos E, Polley EC, Komarow HD, Program NCS, Murray PR, Turner ML, Segre JA. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. **Genome Res.** 2012;22(5):850-9.
7. Zeeuwen PL, van Vlijmen-Willems IM, Hendriks W, Merckx GF, Schalkwijk J. A null mutation in the cystatin M/E gene of ichq mice causes juvenile lethality and defects in epidermal cornification. **Hum Mol Genet.** 2002;11(23):2867-75.
8. Bieber T. Atopic dermatitis. **N Engl J Med.** 2008;358(14):1483-94.
9. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. **Nat Genet.** 2006;38(4):441-6.
10. Jansen PA, Kamsteeg M, Rodijk-Olthuis D, van Vlijmen-Willems IM, de Jongh GJ, Bergers M, Tjabringa GS, Zeeuwen PL, Schalkwijk J. Expression of the vanin gene family in normal and inflamed human skin: induction by proinflammatory cytokines. **J Invest Dermatol.** 2009;129(9):2167-74.
11. Jansen PA, van Diepen JA, Ritzen B, Zeeuwen PL, Cacciatore I, Cornacchia C, van Vlijmen-Willems IM, de Heuvel E, Botman PN, Blaauw RH, Hermkens PH, Rutjes FP, Schalkwijk J. Discovery of small molecule vanin inhibitors: new tools to study metabolism and disease. **ACS Chem Biol.** 2013;8(3):530-4.
12. Pett HE, Jansen PA, Hermkens PH, Botman PN, Beuckens-Schortinghuis CA, Blaauw RH, Graumans W, van de Vegte-Bolmer M, Koolen KM, Rutjes FP, Dechering KJ, Sauerwein RW, Schalkwijk J. Novel pantothenate derivatives for anti-malarial chemotherapy. **Malar J.** 2015;14:169.

### 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 objective of the project is to apply basic knowledge on biology of skin and cutaneous host defense to develop new, effective and safe drugs for AD. These include compounds that promote epidermal barrier function and antimicrobial compounds that aim to correct the skin microbiome. As indicated above, these novel drugs are derived from two classes of compounds: pantothenate derivatives and coal tar components.

We think that these ambitions are timely and achievable. [REDACTED] is home to excellent, state-of-the-art core facilities, including “omics”, advanced microscopy, and flow-cytometry platforms. All animal experiments will be performed at the [REDACTED] and [REDACTED] personnel will be involved in all the experiments and the animal care-taking. The senior team members have years of expertise in drug research for skin diseases. They will be involved with in all aspects of the project and will maintain the overview ensuring that significant progress will be made through prioritizing promising tracks and abandoning “dead-ends”. The drug testing experiments will be done in close collaboration with international experts on CoA biosynthesis. The project is well funded a (ZonMW, Top sectoren, private sector) and has so far generated 2 patents on the pantothenamide compound class. The proposed objectives are achievable within the time frame of the project. More specifically we aim to develop pantothenate derivatives either for systemic use or topical use as a cream or ointment. Lead optimization of candidate compounds is aimed to generate compounds that have antimicrobial properties that target the microbial coenzyme-A biosynthetic pathway.

The coal tar based preparations are extracts or fractions obtained by chromatography that have a vastly improved profile with respect to color/smell properties and safety, whilst retaining the clinical efficacy. The pharmacological target is the AHR, whose activation will be used as an important readout.

---

### **3.3 Relevance**

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

---

Inflammatory skin diseases such as AD are highly prevalent, as outlined above, and a considerable unmet medical need still exists. Basic research over the past decade has uncovered important disease mechanisms of AD. Now is the time to translate these insights into mechanism-based therapeutics.

---

### **3.4 Research Strategy**

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

---

#### **Overall strategy to achieve the major objectives**

Drug development, as a rule, has a number of phases, some of which include the use of experimental animals. We obtained a number of lead compounds, which need to be optimized before they can enter the final preclinical phase and subsequent clinical phases. The overall strategy here is to perform efficacy studies of the lead compounds and to improve the compounds in subsequent rounds of medicinal chemistry. This is an iterative process which includes studies on pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) and mechanism of action (MoA) of the compounds. Efficacy studies are aimed at evaluation of clinical parameters in relevant animal models for a given disease. All these steps include the use of experimental animals.

Figure 1 shows a flow chart of the proposed strategy. From this scheme it is evident that there will be several rounds of lead optimization before clinical candidates are identified. We expect that within the project duration of 5 years we will identify such candidates. In case that the stage of progression to toxicological screening and clinical evaluation is reached earlier, the number of experimental animals will be according lower. The numbers indicated here are maximum numbers.

PK studies will be outsourced and are not part of this application. PK parameters such as bioavailability and clearance of the drugs will be assessed in wild type control animals (mice and rats). This will drive the chemical synthesis (lead optimization) to generate compounds with more favourable PK profiles. MoA studies will be performed *in vitro* and *in vivo*. *In vivo* MoA studies will be both in wild type control animals and animal models for disease, to obtain a more detailed insight in the physiological and biochemical actions of the drug at the level of the organism.

We will use animal models that are relevant for certain aspects of the disease. The effect of the drugs will be monitored on the readout parameters (biological, clinical) to investigate the efficacy of our compounds, the mechanism of action (MoA) and the potential side effects. These models may use genetically modified animals (mice) with a disease phenotype, or use wild type animals (mice, rats) where skin inflammation or infection will be induced by external agents.

Our lab has been involved in drug development for a number of years and we filed a number of patents that cover the use of pantothenamides as anti-inflammatory and antibiotic agents. We are part of consortia from academic and private partners that are developing the pantothenamides and coal tar for clinical applications.

### **Sequence of experiments and go/no-go points**

Drug development is an iterative process, where the outcome of PK and efficacy studies guides the medicinal chemistry efforts (lead optimization). This may lead to improved compounds which are again subjected to PK and efficacy studies. Pharmacokinetics of promising lead compounds will be performed before *in vivo* efficacy tests in experimental animals will be undertaken. When *in vivo* levels are expected to be insufficient for clinical activity, based on extrapolation of *in vitro* data, medicinal chemistry efforts will be directed at improving PK of the compounds.

---

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.

Mice are the preferred animal species in the model systems used here because of the extensive literature data on models for skin inflammation and AD. All studies to study efficacy of coal tar derivatives will be performed in mice.

Pantothenamide-derivatives that show competition with endogenous pantothenate cannot be adequately tested in mice due to the high plasma pantothenate levels (20 micromolar), which will obscure efficacy. For these compounds we will use rats, which have a plasma pantothenate level that is similar to humans (1-2 micromolar).

#### **1. Efficacy and MoA studies of anti-AD drugs**

Drugs will be administered to rats or mice in relevant models that mimic (parts of) the disease phenotype. These models include transgenic or knockout mice with a relevant phenotype such as the arylhydrocarbon receptor (AHR) knockout mouse. These mice are available both via commercial breeders and academic collaboration. We will import these mice to set up a colony for experiments. Other models concern animals that are exposed to external stimuli to elicit an inflammatory response or infection. These are all well known eczema models such as the application of a



contact sensitizer (FITC) or immunization by ovalbumine and subsequent epicutaneous exposure. As infection with *S.aureus* is a relevant disease feature of AD, pantothenamide compounds will be tested in models for infection per se (local or systemic) or AD models with an infectious component. The development of the disease or infection in all these models is monitored by clinical features, microbiology and blood chemistry. Animals are sacrificed at the end of the experiments for analysis of the tissues by histology and molecular biology (qPCR). Drugs for topical use will be administered in a cream or ointment 1 to 3 times daily for up to 4 weeks. Drugs for systemic application will be administered by oral gavage once daily. In case that PK properties of the compounds are unfavourable, we will dose twice daily for up to 1 week, or by administration in the drinking water for prolonged periods up to 4 weeks.

## **2. Experimental animals required for research tools and setting up of the model systems**

In some of the experiments, animal material is required to perform in vitro experiments that cannot be done with cell lines. These experiments include the use of rat or mouse dorsal root ganglion (DRG) cells. These are used to study neuron-skin interaction in the context of itch, which is a hallmark of AD. We have evidence that coal tar preparations act on itch circuits, which will be investigated in vitro with these DRG cells. Another example of animal tissue that may be used are normal rat or mouse liver cells. These cells are cultured and used to test the effect of pantothenate-derivatives and coal tar products on biotransformation and toxicity.

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

---

All activities of the project are focused on the objective of drug development for AD (see figure 1). The project includes two major compound classes, pantothenate-derivatives and coal tar components, that are developed by previous basic research. The different steps of the project (PK, efficacy testing, medicinal chemistry) are interdependent, and may be repeated up to the phase of clinical development.

### **Figure 1**

# Main objective: drug development for atopic dermatitis

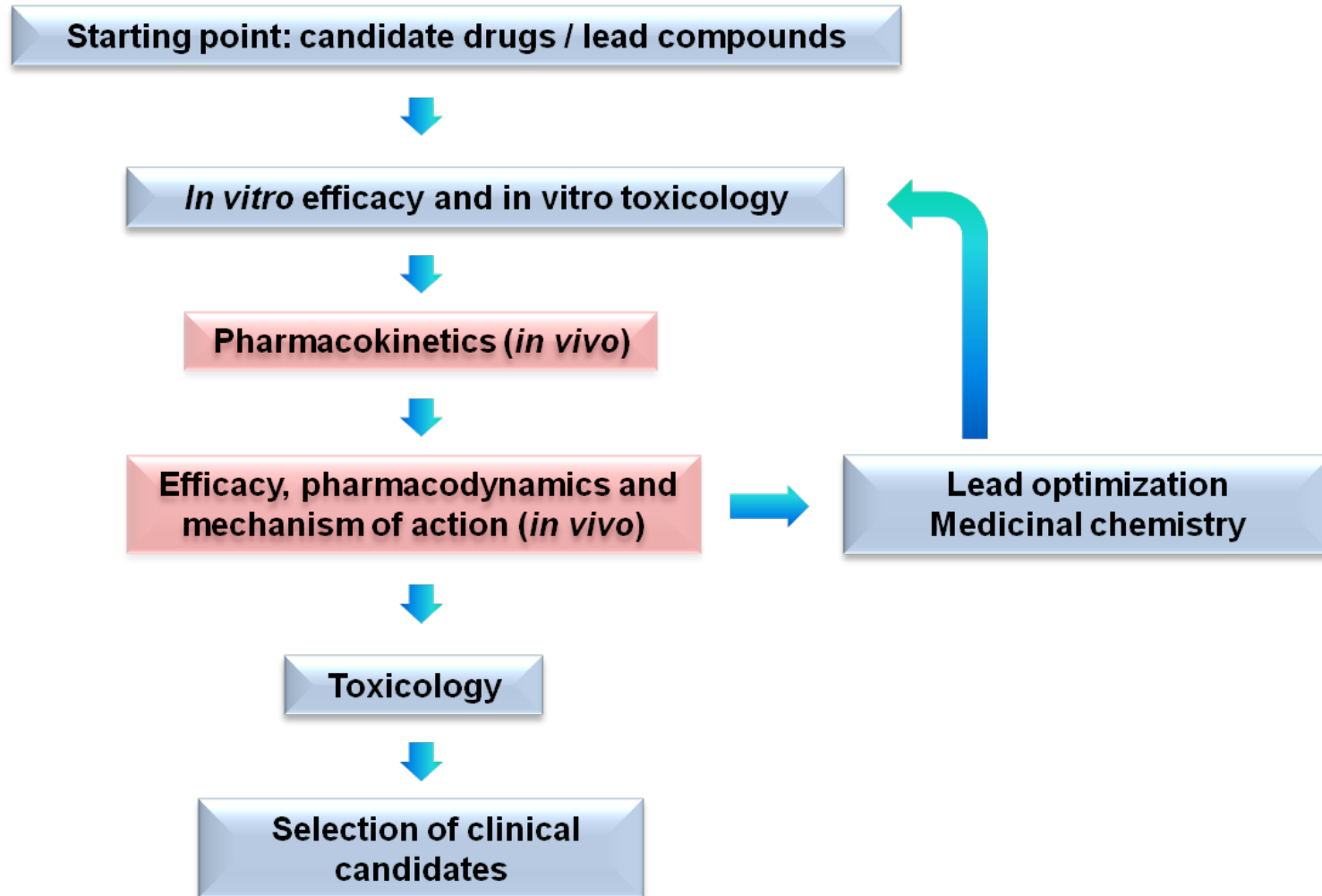


Figure 1: Flow chart of drug development. Red boxes indicate parts that involve experimental animals in the current project. Toxicology is not part of the project. Lead compounds with anti-AD properties *in vitro* are investigated for PK properties (*in vivo*). Efficacy is evaluated by *in vivo* models that mimic aspects of the disease. Candidate compounds are subjected to multiple rounds of lead optimization until progression to the clinical phase.

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	Drug efficacy studies
2	Animals required for research tools

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

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

## 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 efficacy of topical or systemic drugs to suppress clinical, immunological, microbiological and biochemical parameters will be investigated in animals models that mimic aspects of AD, such as barrier disruption, skin inflammation and infection. These models use a genetically modified mouse (the AHR knockout mouse) with a disease-related phenotype, or use wild type animals (mice, rats) where AD features such as skin inflammation, poor barrier function or infection by *S.aureus* will be induced by external agents.

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

---

#### Administration of drugs

Drugs will be administered in a therapeutic regimen, topically in the AD models and systemically in the *S.aureus* infection/colonization models. We will assess macroscopic (clinical) appearance, microscopic features (histopathology of skin), molecular/biochemical parameters (gene expression, enzyme activity), biophysical parameters such as transepidermal water loss (TEWL) and microbial status (bacterial diversity and numbers). Preferably we will use animals of 2 to 6 months of age. In all cases, the animals will be sacrificed at the end of the experiment to collect skin, organs and blood. Animals will be killed by conventional methods like CO2 asphyxiation or cervical dislocation. The choice of the readout parameters is driven by the known abnormalities found in AD.

The drugs that we are currently developing include (1) pantothenate derivatives that are used systemically or topically, and have anti-microbial activity, or (2) coal tar derivatives which are typically used for topical application. Topical drugs are applied in ointment-based formulations at the back, tail and/or ears of the mice. Application will be up to 3 times daily, for a maximum period of 4 weeks. The systemic compounds will in general be administered once daily by oral gavage, at doses up to 500 mg/kg, or in the drinking water, for a maximum of 2 weeks. Only when the pharmacokinetic properties are unfavourable, compounds will be administered twice daily, up to one week.

#### Readout of interventions in the animal models

Biophysical skin properties will be measured by TEWL as an indication of skin barrier function, which is compromised in AD. TEWL measurement involves positioning of an external probe to the skin to monitor the water vapour flux during 1-2 minutes. Animals need to remain motionless, hence the application of anesthesia. TEWL is non-invasive and is not associated with significant discomfort.

Microbiome sampling involves rubbing a shaven area of the skin with a cotton swab (20 times) that is wetted in buffer. This can be done without anesthesia when possible. The fluid collected from the swab contains bacteria that are used for DNA extraction and sequence analysis. This is non-invasive procedure, with mild to moderate discomfort. Microbiome sampling may be performed sequentially as the microbiome continuously changes when the mice develop an AD phenotype.

At the end of the experiments the mice will be sacrificed under anesthesia for collection of skin, blood and organs for histology and biochemical analyses.

### **Genetic animal models**

The arylhydrocarbon receptor (AHR) knockout mouse will be used to monitor the effects of drugs on disease parameters associated with AD. The general procedure will be to breed a sufficiently large number of animals to obtain 10 mice per group for each drug concentration. Only topical preparations will be used for these mice. We have no indication for sex differences in drug response so far, and we will use both males and females.

### **Non-genetic models**

Wild type mice or rats will be subjected to the following model situations for inflammation and infection:

- The mouse tail model: normal mice have different areas of cornification on their tails, some of which resemble normal human skin and others resemble disturbed differentiation seen in human disease. Coal tar preparations will be applied topically to the mouse tail skin to test the effects on skin barrier proteins and morphology. Application will be 3 times daily for 5 days.

- The ovalbumin (OVA)-induced AD model involves epicutaneous (EC) sensitization of tape-stripped skin with ovalbumin [1]. Briefly, the back skin of mice is shaved and tape-stripped 6 times, mimicking skin injury caused by scratching in AD patients. Mice are sensitized with OVA (100 µg) or saline applied in 100 µl to a sterile patch secured to the skin with a transparent bioocclusive dressing. Experiments are performed at the end of the third sensitization. EC sensitized mice develop increased scratching behavior and their skin develops human-like AD lesions. The required seven-week protocol of EC sensitization is necessary to mimic exacerbation of AD over time. Animals will be treated by topical drugs as indicated above, and subjected to the analyses indicated above.

- The Fluorescein isothiocyanate (FITC)-induced contact dermatitis model is characterized by a Th2 immune cell mediated inflammation and exhibits many of the hallmarks of atopic dermatitis [2]. To induce AD-like skin lesions, FITC in dibutyl phthalate mixed 1:1 with acetone will be applied on shaven abdomens and footpads. Thereafter, mice are challenged once a week for 8 weeks with FITC applied to the shaved back skin. After 5 weeks, treatment may be initiated on fully developed lesions. To determine ear swelling as a parameter for inflammation, mice will be sensitized by painting FITC on the shaved abdomen repetitively on day 0, 1, 7 and 8. On day 14, mice are challenged once with FITC on both sides of the ear. Ear swelling will be measured 24 h after the challenge. Animals will be treated by topical drugs as indicated above, and subjected to the analyses indicated above.

- To investigate *S.aureus* targeting drugs on a *S.aureus* infection, the rodent thigh model described by Zhang *et al* [3] will be used. Mice or rats will be rendered neutropenic by i.p. injection of cyclophosphamide before infection. *S.aureus* infection is established by i.m. injection of bacteria in each thigh. Within 24-48 hours after injection of bacteria the antibiotics will be administered systemically and the animals will be sacrificed within 48 hours. The effect of the antibiotic treatment will be monitored by analysis of bacterial numbers (colony forming units) in tissue homogenates.

**References**1. Spergel JM, Mizoguchi E, Brewer JP, Martin TR, Bhan AK, Geha RS. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. **J Clin Invest.** 1998;101(8):1614-22.

2. Dearman RJ, Kimber I. Role of CD4(+) T helper 2-type cells in cutaneous inflammatory responses induced by fluorescein isothiocyanate. **Immunology**. 2000;101(4):442-51.
3. Zhang H, Kalker G, Mani N, Grossman TH. Development and validation of a multi-dose neutropenic rat thigh infection model using real-time monitoring of *Staphylococcus aureus* growth *in vivo*. **In Vivo**. 2008;22(6):667-72.

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

---

At present we do not have information on the variance of the clinical and laboratory parameters of some of the models that we will use, as they need to be implemented (the ovalbumin and FITC models). We will first perform pilot experiments to get an estimate on the biological variation of the output parameters of the models. Based on previous experiments we know that for these analyses 8-10 animals per group are a sufficient number to analyse meaningful differences between the groups (power = 0.8, alpha = 0.05).

## B. The animals

---

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

---

Mice are the preferred animal due to the availability of genetically modified animals and the large body of data in the literature on AD models in mice. Mice are available commercially from EU registered breeders (wild type mice), or via collaboration with other investigators (AHR mice). The numbers of mice to be used for the efficacy studies of both drug classes (pantothenamide and coal tar) are based on 3 experiments per year for the 3 models (mouse tail-OVA-FITC), using 4 groups of 10 mice per experiment. These are extrapolated to a 5 year project period. We need 600 AHR mice for drug testing experiments. WT mice: 3000 for drug testing in the 3 AD models and 600 for the infection model. An additional 450 AHR mice are required for breeding. We need 20 mice per year (100 for 5 years) for pilot experiments to optimize and test practical procedures such as drug application and non-invasive measurements.

In total we need:  $600+3000+600+450+100=4750$  mice for drug efficacy studies in the models indicated above.

Rats (*Rattus sp.*) will be used for particular drugs as outlined above. Rats are available commercially from EU registered breeders. The numbers of rats to be used for the efficacy studies of both drug classes (pantothenamide and coal tar) are based on 3 experiments per year for each model, using 4 groups of 10 rats per experiment. These are extrapolated to a 5 year project period. We need 1200 rats for drug testing in 2 AD models and 600 for the infection model. We need 20 rats per year (100 for 5 years) for pilot experiments to optimize and test practical procedures such as drug application and non-invasive measurements. In total we need:  $1200+600+100=1900$  rats for efficacy studies.

In general we will use adult animals (from 8 weeks onwards). The numbers of animals indicated above are maximum numbers. The numbers include animals required for breeding and for the actual experiments. We have no indication that there are sex differences for the parameters studied, so we will use either males or females.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
AHR mouse	Own breeding	450	Conservational breeding
AHR mouse	Own breeding	600	Young

WT mice	Regular breeding	3700	Young
WT rats	Regular breeding	1900	Young

### 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 have introduced several *in vitro* skin models to mimic human diseases. Some of these models may replace transgenic and knockout approaches when there is a simple epidermal phenotype. For a complex disease as AD, this will not be completely possible.

#### Reduction

We have introduced several *in vitro* skin models to mimic human diseases, including AD. These can be used to investigate certain aspects of the disease but cannot mimic the dynamics and complexity of responses to infection and inflammation.

#### Refinement

In the *S.aureus* thigh infection model, which will be associated with severe discomfort when left untreated, we will carefully monitor the health status of the animals. The animals will be sacrificed before severe discomfort is evident.

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



---

1) Animal welfare will be monitored daily. The research team has many years of experience in breeding and maintaining transgenic mouse models and PK studies. The experiments will be terminated and the animals sacrificed according to pre-specified conditions (see humane endpoints for more details).

2) There are no measurable adverse effects on the environment.

## 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. Our research strategy is unique as far as we are aware.

## 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.

---

## **G. Location where the animals procedures are performed**

---

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.

---

The level of discomfort experienced by the animals in the skin inflammation models is considered to be moderate. Eczema in humans is not painful but causes irritation and itch, and we expect this to be true for the animals as well. The use of analgesics is not required. Infection by *S.aureus* bacteria will cause pain at the site of infection (muscle). We will try to prevent pain as much as possible by early termination of the infection experiment. Pain relief will not be applied as this is likely to interfere with the experiment.

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

---

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

---

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

---

The animals will experience stress due to the experimental procedures and skin irritation/itch as a result form the eczema models.

Explain why these effects may emerge.

---

---

The levels of discomfort are caused by the experimental procedures, such as the induction of skin inflammation, collection of blood samples or the application of anaesthetics.

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

---

Since the levels of discomfort result from the experimental procedures they cannot be prevented. The severity is minimized by closely monitoring the experiment and termination of the experiment if necessary.

### **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 do not expect severe clinical features associated with the proposed tests that would require humane endpoints. The *S.aureus* infection model may cause severe discomfort but the experiment will be terminated before that stage is reached. In case that infection is more vigorous than expected, humane endpoints will be applied. Rapid weight loss, severe distress/pain and abnormal behaviour may be signs of a severe infection and will serve as criteria for euthanasia.

Indicate the likely incidence.

---

There is a slight risk (estimated <10%) that mice of the *S.aureus* infection model may have an unanticipated severe infection that requires termination based on the humane endpoint.

### **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 ).

---

Some experimental procedures are mild to moderate (blood sampling, TEWL, tapestripping, skin swabs, breeding of AHR mice). The experimental inflammation models by ovalbumin or FITC sensitization and experimental *S.aureus* infections cause moderate discomfort. Severe discomfort will be

prevented by application of humane endpoints. In all cases the animals will be sacrificed at the end of the experiments. Mice: 10% mild (animals used for breeding), 90% moderate discomfort. Rats: 100% 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.

---

Organs and blood need to be collected for further studies. Therefore, all animals will be sacrificed, either by terminal retro-orbital or intracardial bleeding under adequate general anaesthesia, or by cervical dislocation.

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Animals required for research tools</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Animals required for research tools
Serial number	Type of animal procedure					
2	Animals required for research tools					

## 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.

---

Itch is a prominent feature of atopic dermatitis, which we will try to model *in vitro*. For *in vitro* atopic dermatitis skin models we study itch responses by coculture of skin cells and dorsal root ganglion (DRG) cells. DRG cells are in general obtained from suitable animals (mice, rats) that are superfluous or unused by other experiments, either from our own or from other investigators. In case that these animals are not available, we will purchase normal mice or rats for this purpose. The animals are sacrificed according to standard procedures and the tissue of interest is dissected to obtain the DRG cells. Rat DRG will be used mostly as these are the preferred animal based on literature studies. An additional advantage is that the cell yield is bigger than for mice. DRG cells will be used to make skin constructs. One rat will yield about 30 DRG (106 cells in total) which are used for one skin construct. We estimate that we will generate a maximum of 50 skin constructs per year (250 rats in 5 years). In certain cases when mouse specific reagents will be used in the *in vitro* systems, we will use mouse DRG up to an estimated maximum of 50 mice per year (250 in 5 years).

We will occasionally need rat liver cells e.g. to study biotransformation of drugs *in vitro*. For this reason we will sacrifice normal rats to dissect the livers. (a maximum of 50 rats in 5 years). Cells will be cultured and drug metabolism *in vitro* will be studied by LC-MS.

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

---

Anesthesia followed by euthanasia.

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

---

Not applicable

### B. The animals

---

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

---

Rodent ganglion cells have been used in the past by us to set up the model, and they are the preferred source as human DRG cells are not available. Rat liver cells are the preferred cell type to study drug biotransformation *in vitro*. We will use young animals of either sex.

We need a maximum of 100 rats and 100 mice per year for DRG cell isolation. We need 10 rats per year for liver cell isolation. This adds up to 550 rats and 500 mice for the 5 year project.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
WT mice	Regular breeding	250	Young
WT rats	Regular breeding	300	Young

### 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

The *in vitro* assays are in itself a replacement of *in vivo* animal studies. We need the rodent DRG cells as human cells are not available, nor suitable cell lines.

#### Reduction

Not applicable

#### Refinement

Not applicable

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

---

- 1) Not applicable
- 2) There are no measurable adverse effects on the environment

## 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.

---

This is a novel and unique research project

## 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?

---

The animals will experience stress.

Explain why these effects may emerge.

---

The animals will experience stress due to anesthesia.

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

---

---

Since the levels of discomfort result from the experimental procedures they cannot be prevented.

---

**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 ).

Most of the animals will experience mild discomfort as they will be anesthetized before they are killed for organ collection.

## 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 are killed to obtain the desired material.

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

---

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

---

Yes

---

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0174
2. Titel van het project: Drug development for atopic dermatitis
3. Titel van de NTS: Geneesmiddelenontwikkeling voor atopisch eczeem
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 22-12-2015
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 05-01-2016
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 13-01-2016 tot 20-01-2016
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 20-01-2016 en 09-02-2016
  - advies aan CCD: 15-02-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 13-01-2016
  - Strekking van de vragen:

### Project Proposal:

-3.1 De onderzoekers willen twee verschillende medicijnen ontwikkelen voor hetzelfde doel. Kunnen zij aannemelijk maken waarom er meerdere medicijnen ontwikkeld moeten worden? Zijn de medicijnen uit de twee onderscheiden klassen bijvoorbeeld gericht op verschillende patiëntenpopulaties? Wanneer de twee medicijnen na elkaar onderzocht zouden worden, zou men het onderzoek naar het tweede medicijn achterwege kunnen laten indien het eerste medicijn effectief blijkt te zijn. Hierdoor wordt een flinke vermindering van het aantal proefdieren gerealiseerd.

-3.1 Eén van beide medicijnen is een afgeleide van een al bestaand effectief medicijn. De commissie vindt de gegeven redenen voor het ontwikkelen van dit afgeleide medicijn uitsluitend van cosmetische aard, en vraagt zich af of deze redenen wel voldoende zwaarwegend zijn voor het doen van dierproeven. Indien de onderzoekers menen dat er wel degelijk zwaarder wegende redenen zijn voor dit onderzoek, dan worden zij verzocht deze goed te omschrijven.

**Description of Animal Procedures:**

DAP1

-D: Het aantal dieren bij onderdeel B is berekend op groepen van 3, terwijl hier groepen van 2 dieren worden beschreven. De onderzoekers worden verzocht de groepsgrootte in overeenstemming met elkaar brengen en het totaal aantal dieren aan te passen indien groepen van 2 dieren worden gebruikt.

DAP2

-A: Driemaal daags een orale gavage levert behoorlijk wat ongerief voor de dieren. De onderzoekers worden verzocht het aantal gavages te beperken tot één per dag, of een andere toedieningsroute te gebruiken.

-J, tweede vraag: Een geschat percentage van de incidentie ontbreekt nog

-K: Er is sprake van licht ongerief voor 10% van de muizen. Kunnen de onderzoekers aangeven welke muizen zij hiermee bedoelen?

DAP4

-B.:De onderzoekers vragen 100 dieren per jaar voor het isoleren van DRG cellen. Kunnen zij met een berekening aannemelijk maken waarom zij deze aantallen nodig hebben? Deze berekening bevat bij voorkeur het aantal DRG cellen dat nodig is voor het in vitro model en het aantal DRG cellen dat uit een dier geogst kan worden.

- Datum antwoord: 09-02-2016
- Strekking van de antwoorden:

**Project Proposal:**

-3.1 NTS en de PP zijn drastisch herschreven om de lezer er op te wijzen dat a) huidziekten geen cosmetisch probleem zijn, b) er vanuit het oogpunt van de heterogeniteit in oorzaak en ernst van de ziekte behoefte is aan meerdere therapeutische opties (personalized medicine !). Er wordt één ziekte (eczeem) bestudeerd waarvan voor twee aspecten van de aandoening een nieuwe therapeutische benadering wordt onderzocht.

-3.1 In de PP wordt nu uitgelegd wat het probleem is met koolteer als therapie, en waarom de modificaties die de onderzoekers voorstaan niet van 'cosmetische' aard zijn. Het gaat om het verhogen van de veiligheid (minder PAKs) en patiëntvriendelijkheid. Door gebrek aan compliance van patiënten dreigt een effectieve en goedkope therapie te verdwijnen. Koolteer wordt in Nederland als een geneesmiddel beschouwd en modificaties daarvan zullen aan de daarmee gepaard gaande eisen van effectiviteit en veiligheid moeten voldoen.

**Description of Animal Procedures:**

DAP1

-DAP1 (PK) is vervallen

DAP2

-A: De PK bij knaagdieren is vaak zodanig dat éénmaal daags doseren niet genoeg is om therapeutische spiegels te bereiken. Wij zullen in voorkomende gevallen toch 2x daags doseren.

-J, gedaan

-K: Dit zijn de muizen die nodig zijn voor de fok (450 stuks)

DAP4

-B.: Dit is nu DAP2 geworden. Aantal is gebaseerd op ervaring met celopbrengst en gewenste aantallen huidconstructen. Berekening is toegevoegd.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

**B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig.
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. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop new, effective, and safe drugs for AD.' De onderzoekers focussen daarbij op het ondersteunen van de barrièrefunctie van de huid en correctie van het microbioom van de huid door pantothenaat derivaten en teerzalf extracten. Het werkingsmechanisme van deze stoffen zal op moleculair niveau onderzocht worden. Deze kennis zal bijdragen aan het ontwerpen van effectieve medicijnen voor atopische dermatitis. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat atopische dermatitis veel voorkomt bij jonge kinderen en niet alleen tot ernstige klachten kan leiden, maar ook een grote impact heeft op het sociaal functioneren van patiënten en hun naasten. De tot nu toe beschikbare medicijnen kunnen niet langdurig gebruikt worden, bevatten giftige componenten, of hebben andere beperkingen in het gebruik. De DEC acht de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor gebruik bij atopische dermatitis van substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de

voorgestelde dierproeven. Zij hebben belangrijke samenwerkingsverbanden met internationale experts op het gebied van Co-enzym-A biosynthese. Ook hebben zij voldoende financiering voor het bereiken van de doelstelling. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare inzichten in het werkingsmechanisme van teerzalfextracten en (varianten van) pantothenamides bij muizen of ratten, waardoor effectieve medicijnen ontwikkeld kunnen worden voor atopische dermatitis.

5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de muizen en ratten wordt hoofdzakelijk bepaald door de gebruikte modellen voor dermatitis. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde toediening van medicijnen gedurende maximaal twee weken p.o. (maximaal tweemaal per dag), i.v., i.p., s.c. of op de huid, het meten van het vochtverlies door de huid onder anesthesie, het nemen van microbiom samples, het doden onder anesthesie, en de i.m. toediening van *S. aureus* in als licht. De DEC schat het ongerief als gevolg van het aanbrengen van het OVA-model, het FITC-model en het gebruikte intramusculaire *S. Aureus* model in als matig. De DEC is van mening dat de combinatie van deze factoren tot maximaal matig ongerief voor de dieren leidt. Het cumulatief ongerief voor de muizen en ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 14% van de muizen en 14% van de ratten, en matig voor 86% van de muizen en 86% van de ratten.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De immunoreactie in de huid bij atopische dermatitis is dermate complex, dat het effect van medicatie alleen *in vivo* goed bestudeerd kan worden. De toxiciteit van de medicijnen wordt in *in vitro* modellen bepaald, zodat hiervoor geen proefdieren worden ingezet. De onderdelen van het onderzoek die *in vitro* uitgevoerd kunnen worden, zijn al uitgevoerd of zullen *in vitro* uitgevoerd worden. Voor de resterende onderzoeksvragen is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door het inbouwen van relevante go/no go momenten en door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolgentoelagen wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 5000 muizen en 2200 ratten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Door de toxiciteit van nieuwe medicijnen eerst *in vitro* uit te testen, wordt het risico op onverwachte bijwerkingen verkleind. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.  
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

#### **D. Ethische afweging**

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het werkingsmechanisme van teerzalfextracten en (varianten van) pantothenamides bij muizen of ratten, waardoor effectieve medicijnen ontwikkeld kunnen worden voor atopische dermatitis. Het belang van meer inzicht in de moleculaire werkingsmechanismen van deze stoffen en het beschikbaar komen van nieuwe medicijnen voor atopische dermatitis acht de DEC substantieel, gezien de prevalentie van atopische dermatitis en de impact van deze aandoening op patiënten en hun directe omgeving. De huidige medicijnen voor deze aandoening kunnen namelijk niet langdurig gebruikt worden, bevatten giftige componenten of hebben andere beperkingen in het gebruik.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 14% van de muizen en 14% van de ratten licht ongerief zullen ondervinden en 86% van de muizen en 86% van de ratten matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de gebruikte modellen voor dermatitis in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB (628) 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  
AVD103002016426

**Bijlagen**

2

Datum 17 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016426. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

## **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300  
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:   
KvK-nummer: 41055629  
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
IBAN: NL90ABNA0231209983  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB (628) NIJMEGEN

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: 16 maart 2016  
Geplande einddatum: 16 maart 2021  
Titel project: Drug development for atopic dermatitis  
Titel niet-technische samenvatting: Geneesmiddelenontwikkeling voor atopisch eczeem  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ( [REDACTED] )  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1187,-  
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: Nijmegen  
Datum: 16 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor Dierwelzijn  
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  
AVD103002016426  
**Bijlagen**  
2

Datum 17 februari 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 17 februari 2016  
Vervaldatum: 18 maart 2016  
Factuurnummer: 16700426  
Ordernummer: 040823-461220/2015-0174/[REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016426	€ 1187,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS0569996317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB (628) 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  
AVD103002016426

**Bijlagen**

1

Datum 8 april 2016

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 17 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Drug development for atopic dermatitis" met aanvraagnummer AVD103002016426. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Drug development for atopic dermatitis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 8 april 2016 tot en met 31 maart 2021. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag omdat de aanvraagdatum in het verleden ligt.

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 15 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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

**Bezwaar**

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

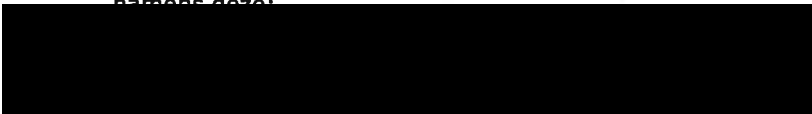
**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:



**I. G. de Peuter**  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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



## **Projectvergunning**

### **gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven**

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

**Adres:** Postbus 9101

**Postcode en plaats:** 6500 HB NIJMEGEN

**Deelnemersnummer:** 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 08 april 2016 tot en met 31 maart 2021, voor het project "Drug development for atopic dermatitis" met aanvraagnummer AVD103002016426, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

[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 17 februari 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 februari 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 februari 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 februari 2016, ontvangen op 13 april 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Drug efficacy studies	Muizen (Mus musculus) / wt en ahr muizen	4750	100% Matig	
Drug efficacy studies	Ratten (Rattus norvegicus) / wild type	1900	100% Matig	
Animals required for research tools	Muizen (Mus musculus) / wild type	250	100% Licht	
Animals required for research tools	Ratten (Rattus norvegicus) / wild type	300	100% Licht	

#### Voorwaarden

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

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

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

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 22 april 2016 11:36  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD103002016426

Geachte RU DEC,

Op 17-02-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Drug development for atopic dermatitis' met aanvraagnummer AVD103002016426.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Inventaris Wob-verzoek W16-13S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016427</b>								
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 oud				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	DEC-advies herzien				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	
11	Mail terugkoppeling DEC 5-4-2016				x		x	x	

AVD 10500 2016 427



22 MAART 2016

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Rijksuniversiteit Groningen</td></tr> <tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr> <tr><td>KvK-nummer</td><td>1 1 7 9 0 3 7</td></tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	1 1 7 9 0 3 7									
Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	1 1 7 9 0 3 7																
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>A, Deusinglaan 1, [Redacted]</td></tr> <tr><td>Postbus</td><td></td></tr> <tr><td>Postcode en plaats</td><td>9713AV GRONINGEN</td></tr> <tr><td>IBAN</td><td>NL80ABNA0446049352</td></tr> <tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Rijksuniversiteit Groningen</td></tr> </table>	Straat en huisnummer	A, Deusinglaan 1, [Redacted]	Postbus		Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN	IBAN	NL80ABNA0446049352	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen					
Straat en huisnummer	A, Deusinglaan 1, [Redacted]																
Postbus																	
Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN																
IBAN	NL80ABNA0446049352																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 1 6 |
| Einddatum  | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- |   |
|---|
| Brain protective strategies using hibernation and hibernation-derived |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- |   |
|---|
| Preventie van de ziekte van Alzheimer door winterslaap en winterslaap-afgeleide stoffen |
|---|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                              |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-RUG                      |
| Postadres   | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl         |



## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.187,00 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
- 2 appendices

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam [REDACTED]

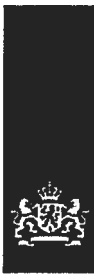
Functie [REDACTED]

Plaats Groningen

Datum 21 - 03 - 2016

Handtekening [REDACTED]





## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager | Rijksuniversiteit Groningen  
Postcode | 9713 AV | Huisnummer | 1

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?

*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*

Aanvraagnummer | AVD 10500 ~~16427~~ 2016 427

### 2 Bijlagen


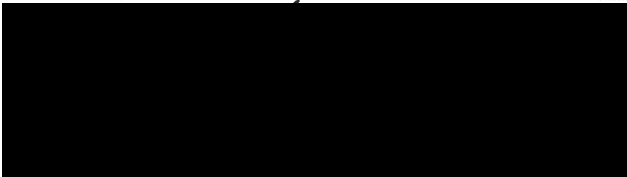
2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*

Aanvraag projectvergunning

### 3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Naam |   
Datum | 21-3-2016  
Handtekening | 

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK 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.zbo-ccd.nl](http://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'.
- 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 animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

---

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

---

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
  - For routine production, describe what will be produced and for which uses.
  - For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.
-

Motivation:

Alzheimer's disease is one of the most prevalent chronic neurodegenerative diseases, characterized by memory loss, and disturbances of speech, visiospatial function, planning and judgment. Although the course of Alzheimer's may vary, life expectancy is dramatically reduced compared to healthy peers. Apart from loss of neurons, [REDACTED], [REDACTED], inflammation, oxidative stress and finally loss of neurons. [REDACTED] causes disintegration of the microtubule network leading to a collapse [REDACTED]. Despite major research efforts, underlying [REDACTED] processes still remain elusive, and therapy is mainly symptomatic.

The current project investigates the therapeutic potential of hibernation itself and hibernation-derived [REDACTED] in Alzheimer's disease. As hibernation consists of multiple protective processes, we investigate in appendix 1 the broad question whether natural hibernation restricts progression of Alzheimer's disease. In the second project (appendix 2) we focus on one of the major protective mechanisms in hibernation by [REDACTED]

Context:

Hibernators survive without organ damage at the extremes of physiology. Our research group is investigating the mechanisms of hibernation to understand the adaptive mechanisms involved, and to identify key regulatory targets that may be used to develop novel therapeutic strategies which may be employed in non-hibernating species. In the past years, we have investigated [REDACTED], and identified immunosuppressive mechanisms and the importance of [REDACTED] to alleviate oxidative and organ damage. By activating these protective pathways, hibernation itself may thus convey protective effects in conditions that are characterized by inflammation and/or oxidative stress. Moreover, based on the mechanism used by hibernators [REDACTED] we have developed drugs ([REDACTED]) that preserve these pathways in conditions of inflammation and/or oxidative stress, both in cell cultures, in the whole body cooling and in cooling and rewarming in rat and type 2 diabetes in the mouse.

*Hibernators repair organ damage during arousals*

The key to hibernation is a substantial suppression of [REDACTED] of normal, which subsequently results in [REDACTED]. Rather, periods of [REDACTED], which last < 24h. Nevertheless, molecular markers and immunohistochemistry show that organ damage does develop [REDACTED]. Remarkably, this damage is fully reversed during [REDACTED]. Consequently, many believe that hibernators encompass highly effective repair mechanisms allowing them to completely clear cell or organ damage during [REDACTED]. Interestingly, hibernating animals show extensive [REDACTED] and have the extraordinary ability to maintain [REDACTED] architecture and function despite [REDACTED]

Interestingly, recent observations indicate a decreased [REDACTED]

[REDACTED] H<sub>2</sub>S has furthermore been implicated in the regulation of [REDACTED]

extracellular matrix throughout the hibernating body. Interestingly, reducing [REDACTED]. We have observed [REDACTED] to counteract protein [REDACTED]. Thus, [REDACTED] and [REDACTED]. In hibernation, [REDACTED] is characterized by the upregulation of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]. Finally, [REDACTED] is regarded in general as a state with highly efficient repair of organ damage, including [REDACTED]. Consequently, we hypothesize that natural hibernation will prevent or slow down progression of Alzheimer's disease. Collaboration partners on the project, [REDACTED], have extensively characterized [REDACTED].

#### *[REDACTED] offer protection against oxidative damage in various diseases*

Adequate coping with oxidative stress is an important factor in determining lifespan and health span. Boosting a subject's anti-oxidant defense promotes longevity and mitigates disease progression in highly prevalent conditions including cancer, diabetes and cardiovascular, neurologic and renal diseases in the experimental setting [14] and may substantially slow down development of Alzheimer's disease. Disappointingly, in humans, oral administration of anti-oxidants is generally ineffective to substantially prolong life or slow down disease progression [15]. Main reasons are thought to include the pro-oxidative action of high doses of antioxidants through the Fenton reaction (see for review [16]) and inadequate tissue penetration. Thus, novel strategies providing an effective [REDACTED] effect are warranted. We recently disclosed a novel anti-oxidant mechanism to attenuate cellular damage in a hibernator [REDACTED]: [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [3,17,18]. We further found that the [REDACTED] is strongly activated by [REDACTED]. Administration of both compounds provides organ protection in [REDACTED] [REDACTED] [19]. Also, we have demonstrated that the [REDACTED] is downregulated in a number of chronic disease conditions [REDACTED]. A tight control of the [REDACTED] is coherent with recent studies in which [REDACTED] as a [REDACTED] with potent anti-oxidative properties and cellular protective actions [REDACTED]. Of note is that the currently identified [REDACTED], are not suited for clinical use because of anticipated side-effects due to [REDACTED]. Thus, we initiated the development of new chemical entities, [REDACTED], which by now have proven to protect from oxidative damage in a variety of cells [REDACTED]. These [REDACTED], mimic the effects of [REDACTED] on mitochondria and increase ATP-production by mitochondria, while precluding the production of ROS. Moreover, these compounds –like [REDACTED]– preserve expression of [REDACTED] under these conditions. [REDACTED] in Alzheimer's disease.

### 3.2 Purpose

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

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



The main objective of the project is to explore the effectiveness of hibernation and [REDACTED] of Alzheimer's disease. In this project we (1) explore whether hibernation can be used as an interventional strategy to limit organ damage by studying disease progression in hibernating Alzheimer's disease mouse models, (2) test the efficacy of [REDACTED] to protect from Alzheimer's disease and (3) investigate the relevance of the [REDACTED] pathway herein.

This purpose is achievable as we have employed the animal models previously and relevant analysis procedures are available.

Aim 1: Repair of organ damage [REDACTED]

[REDACTED] in Alzheimer's disease. Hence Alzheimer's disease models constitute a rational choice to explore possible beneficial effects of hibernation on the disease. We have 2 models of [REDACTED] operational in the mouse, [REDACTED] in order to explore the benefit of regular hibernation in short-term and long-term experiments. Using hibernation as a model in mice enables the use of genetic models of disease. The use of [REDACTED] mice, continuous measurement of [REDACTED] of the mice and variation of [REDACTED] enables matching of hibernating animals to adequate control groups.

Aim 2: compounds appeared effective and were well tolerated in other disease models. We have recently tested one of the [REDACTED]. Intravenous administration of the compound for 4 h in rat and s.c. infusion for 8 weeks in [REDACTED] mouse proved both efficacious in reducing organ damage ([REDACTED]), without any adverse effects. Thus, it seems highly feasible to test the compound in other disease models.

Aim 3: we have recently generated a [REDACTED] knock-out mouse, in which deletion of the [REDACTED] gene may be accomplished in a time and tissue specific manner after crossing with the appropriate Cre-mice (conditional knock-out). Moreover, an even more extensive disruption of [REDACTED] may be accomplished by crossing the [REDACTED] knock-out mice with mice knock-out for additional enzymes, [REDACTED]. Experiments outlined under aim 1 and 2 are also performed in conditional CBS KO mice and crossings, thus enabling dissecting of the importance of [REDACTED] synthesis in the [REDACTED] of Alzheimer's disease and in the mechanism of action of both interventions.

---

### 3.3 Relevance

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

Societal relevance:

This project will generate data on the efficaciousness of a novel class of drugs, with potentially high impact in a major disabling disease prevalent in an aging population. Moreover, this project will investigate the highly promising field of [REDACTED] targets for the treatment of Alzheimer's Disease. And it will furthermore engage MD/PhD students, thus familiarizing future clinicians with cutting edge preclinical research.

Scientific impact:

This work will test the novel concept of exploiting the repair function of hibernation in Alzheimer's disease. Further, it will generate scientific data on the action of a novel class of drugs and deepen our understanding of the role of (derailed) mitochondrial function in Alzheimer's diseases. Finally, it will give us more insight in the process of hibernation itself.

---

### 3.4 Research strategy

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

We employ mouse as the experimental animal of choice in this project. First, relevant Alzheimer's disease [REDACTED] and an extensive molecular toolbox are available to explore progression of disease. We propose to employ [REDACTED] the generalizability of results. Secondly, mice are [REDACTED] and we have the expertise to [REDACTED] in mice both in short-term and long-term protocols. Thirdly, we obtained data on pharmacokinetics of the [REDACTED] in mice, allowing the design of optimal dosing protocols.

This project thus encompasses three major animal experimental activities:

- (i) Hibernation experiments in Alzheimer's disease mouse models. Here we test a complete novel concept to use hibernation as a strategy to limit disease progression.
- (ii) Pharmacological intervention studies with [REDACTED] in Alzheimer's disease mouse models.
- (iii) Experiments outlined under 1 and 2 in [REDACTED] knock-out animals and mice knock-out for [REDACTED] production.

Analysis of these experiments will be on the level of the (patho)physiology of the whole animal and/or on the biochemical, molecular, electrophysiological and histological level in sampled blood and organ tissue.

---

#### 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.

---

Animal models constitute neurodegenerative disease models of Alzheimer's disease, i.e. nucleus basalis (NB) lesion model, J20 model and APP/PS1 model.

- (i) Hibernation experiments in Alzheimer's disease mouse models. Initial experiments explore the potential benefit of a limited number of [REDACTED] cycles by studying histochemical and molecular markers of the disease (e.g. [REDACTED]). Further experiments will be directed at demonstrating the long-term benefit of hibernation on disease progression and include [REDACTED] tests and testing of [REDACTED] in addition to histochemical and molecular markers.
- (ii) Pharmacological intervention studies in Alzheimer's disease mouse models. Initial experiments, conducted under [REDACTED], consist of a comparison of i.v. injection with oral administration of selected compounds. Based on preliminary data, we expect that oral administration may be employed in all long-term studies. The interventional studies will employ chromanol-based compounds for which pharmacokinetics in mouse are known. [REDACTED] more slowly are used as positive control.
- (iii) Hibernation experiments and pharmacological intervention studies in Alzheimer's disease mouse models knock-out for [REDACTED] or other genes. Based upon results from the prior experiments, additional experiments are foreseen, aiming to unravel or confirm molecular mechanisms involved, by examining the efficacy of hibernation and different compounds in mouse models that are (conditionally) knock-out for one or more of the [REDACTED] and/or other genes.

In addition to [REDACTED], molecular, biochemical and histochemical analyses will be used to identify mechanisms and assess the efficacy of interventions in these animal studies.

---

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

---

The project seeks to alleviate progression of Alzheimer's disease by [REDACTED]. Moreover, the project explores the role of [REDACTED] or other signaling pathways herein.

Ideally, the course of the project takes maximum profit of prior experiments. The preferred project is built up is listed below. However, there are no strict go/no-go decisions in terms of halting the project, but rather the optimal next step is defined. In that sense, accomplishments rather represent milestones and are defined as such below.

Phasing:

1) characterization of molecular changes in [REDACTED] induced by [REDACTED].

a) Controls: compare protein expression in different time points throughout [REDACTED]

b) Controls: compare [REDACTED] & identify optimal [REDACTED]

Milestone 1: optimal [REDACTED]

c) Examine [REDACTED] using optimal protocol as protein expression methods are available

d) Examine controls and [REDACTED] at additional stages of ageing

e) Examine [REDACTED] and at different ages

Milestone 2: molecular changes by hibernation in control and Alzheimer

2) [REDACTED] testing in [REDACTED]).

a) If 1 fails: Conducting this protocol is of interest even if [REDACTED] fails, as this model introduces [REDACTED].

b) If 1 succeeds: the best model will be used

Milestone 3: effectiveness of hibernation in limiting Alzheimer's

1) Testing of compounds in Alzheimer's

a) [REDACTED]

Milestone 4: optimal treatment protocol with compounds

b) [REDACTED], different timepoints

c) [REDACTED], different timepoints

Milestone 5: effectiveness of [REDACTED]

3) Testing of knock-outs on Alzheimer development and/or efficacy of hibernation/compounds

a) If both hibernation and compounds fail: genetic boosting of [REDACTED] will be examined together with knock-outs

b) If either or both succeed: investigate as planned in optimal model

Milestone 6: involvement of [REDACTED]

c) If auxiliary [REDACTED] emerge in the mean time: examine Alzheimer development and/or efficacy of hibernation/compounds in appropriate knock-outs

Milestone 7: involvement of auxiliary pathways

As we have already identified efficacious compounds, experiments [REDACTED]

independent and constitute the initial phase of the project and hence both marked as 1). In the phase 3 of the project, the development of Alzheimer's disease [redacted] will be examined. Subsequently, the influence of conditional knock-out on the therapeutic effect of hibernation will be examined.

Adding up the number of animals requested in all appendices, the total project comprises 4066 mice. However, it seems unlikely this amount will ultimately be needed as these numbers represent the grand total should all conditions be examined. We expect major parts of specific project to benefit considerably from others to limit e.g. by identifying the optimal [redacted].

Specific synergies that are present in this project constitute:

Appendix 1 and 2 address Alzheimer's disease; here we expect the analysis of the [redacted]

#### Reference List

1. [redacted]
2. [redacted]
3. [redacted]
4. [redacted]
5. [redacted]
6. [redacted]
7. [redacted]
8. [redacted]
9. [redacted]
10. [redacted]
11. [redacted]
12. [redacted]
13. [redacted]

14. [Redacted]
15. [Redacted]
16. [Redacted]
17. [Redacted]
18. [Redacted]
19. [Redacted]
20. [Redacted]
21. [Redacted]
22. [Redacted]
23. [Redacted]
24. [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	Effectiveness of hibernation in mouse Alzheimer's disease models
2	Effectiveness of [Redacted] mouse Alzheimer's disease models

## 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](http://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'.	10500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Effectiveness of hibernation in mouse Alzheimer's disease

*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.

Alzheimer's disease is one of the most prevalent chronic neurodegenerative diseases, characterized by memory loss, and disturbances of speech, visiospatial function, planning and judgment. Apart from [REDACTED], the disease features two important [REDACTED] characteristics: [REDACTED]

[REDACTED], inflammation, oxidative stress and finally loss of [REDACTED]

[REDACTED]. Despite major research efforts, underlying neurobiological processes still remain elusive, and therapy is mainly symptomatic.

In this appendix, we explore whether natural hibernation will prevent or slow down progression of Alzheimer's disease. Collaboration partners on the project, [REDACTED] protein expression[1,2].

In this appendix, two mouse Alzheimer's models will be used:

- [REDACTED]
- [REDACTED]

These mouse models have been used before in our institution, using both the analysis of [REDACTED] and molecular analysis.

We have 2 models of [REDACTED] in short-term and long-term experiments, respectively. The use of [REDACTED] of hibernating animals to adequate control groups.

We divided the project in 3 phases:

Phase 1: we employ [REDACTED] as a logistically easy, cheap and rapid method to check the proof of concept of [REDACTED] Alzheimer's brain. [REDACTED] changes in control and

Alzheimer's mice of different age.

Phase 2: experiments are refined by including the [REDACTED] aspects by applying different [REDACTED], in addition to the collection of [REDACTED] material.

Because [REDACTED] needs to be induced for a longer time period, for which the [REDACTED] is more fitting.

Phase 3: relevant experiments are repeated in mice conditionally knocked-out for [REDACTED] [REDACTED].

Primary outcome measures constitute of well known parameters to quantify Alzheimer's disease in mice:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

#### Reference List

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]
3. [REDACTED]



4. [REDACTED]
5. [REDACTED]
6. [REDACTED]
7. [REDACTED]
8. [REDACTED]
9. [REDACTED]
10. [REDACTED]
11. [REDACTED]
12. [REDACTED]

---

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

Alzheimer models:

Two transgenic models are employed to increase generalizability of findings as they represent two distinct [REDACTED]. Furthermore, both models are affected differently on the d [REDACTED].

- [REDACTED]
- [REDACTED]

All models are operational in our facilities with appropriate conditions and expert technical knowledge and skills available to examine behavioral, molecular and (immuno)histochemical effects.

Induction of hibernation:

Two methods are used, i.e. overnight fasting and working for food:

[REDACTED]

[REDACTED]

Surgery for [REDACTED]

A [REDACTED] at least a week before start of the protocol under isoflurane anesthesia.

Euthanization of mice:

Animals for molecular [REDACTED] analyses are sacrificed by cervical dislocation without anesthesia, followed by [REDACTED] and subsequent harvesting of other organs. Cervical dislocation is the preferred method as (1) anesthesia affects [REDACTED]

[REDACTED] (2) induction of anesthesia inevitably produces considerable stress (both by smelling of the volatile anesthetic and in the following excitation phase), which releases stress hormones also influencing [REDACTED] [8,9]). In addition, the group of mice that will be used to study [REDACTED]

[REDACTED] measurements suggest that animal welfare is unaffected by euthanization [REDACTED] [10]. Animals will be handled regularly throughout the protocol to [REDACTED]

[REDACTED].

Mice that will be used for immuno-histochemical analyses will be perfused with 10% PFA under full isoflurane anesthesia. Since proper immuno-histochemical analyses is only possible when [REDACTED] are perfused and the planned immuno-histochemical analyses are not affected highly by modulation of [REDACTED] these mice will be anesthetized.

Behavioral tests:

[REDACTED]:  
The mice will be [REDACTED]

Two of the below listed behavioral tests (depending on the model and initial results in [REDACTED]) are performed to [REDACTED]

[REDACTED]: Mice are placed [REDACTED]

[REDACTED]: Before testing, [REDACTED]

[REDACTED]

. This is followed by

#### Immunohistochemical analyses:

Four out of ten animals from the groups will be sacrificed for immunohistochemical analyses of . For proper immunohistochemical analyses perfusion of the mice . Mice will be fully anesthetized and perfused with 10% PFA.

#### Proteomics:

For proteomic analyses from 6 out of 10 animals will be used.

#### Experimental setup and planning:

Animals are randomly allocated to groups undergoing hibernation and control groups.

In phase I experiments consist of the analysis of reversal of molecular features of Alzheimer's brain in mice

. Control animals receive a as these mice, but the

The following groups are studied:

- a. Molecular markers measured by immunohistochemistry (IHC; anesthetized perfused animals). Initial experiments will be conducted only if no changes are observed, will be tested. This results in 2 models x x 6 animals x 2 groups (both hibernating and control animals) = 72 animals. At the will also be acquired from hibernating animals and time matched controls during requiring 2 additional timepoints x 2 models x 6 animals = 24 animals. Total amounts 96 animals.
- b. Proteomics analysis (. Similar groups will be included, at the optimal from part a. at an n=8 since statistical power is lower in proteomic analyses. Thus, this amounts 2 models x 8 animals x 2 groups (both hibernating and control animals) = 32. Moreover samples are also obtained during in the optimal model = 2 timepoints x 8 animals x 1 model = 16 animals. Total is 48 animals.
- c. ). Testing will be performed at the most optimal and the most optimal model only (a & b) and thus requires 1 model x 12 animals x 2 groups = 24 animals. In addition samples from require 2 timepoints x 12 animals = 24 animals. Total is 48 animals.
- d. Mice of different age / stage of Alzheimer's. Experiments from a to c provide and differences between of Alzheimer's mouse models of age 3 months. To explore hibernation effects at different stages of Alzheimer's, experiments are performed at 2 later timepoints (4.5 and 6 months of age) in the most optimal model. This requires 2 ages x 1 model x (3 techniques: 6 (IHC) + 8 (proteomic analyses) + 12 =26) animals x 2 groups = 104 animals.

Phase I thus comprises of 296 animals of which 148 are .

In phase II, the effect of longer-term and molecular changes is tested employing the model. Initial experiments will

be conducted [redacted] only if no changes are observed, [redacted] will also be tested. Should a major [redacted] exist, [redacted] will be tested as well. Per Alzheimer's model, 2 interventions are studied, i.e. where [redacted] prior to and after development of [redacted] month old animals, respectively). In addition to [redacted] groups are included: (i) yoked controls adjusted in [redacted] level) and (ii) animals [redacted] conditions not showing [redacted]. The following groups are studied:

- a. [redacted] A complete protocol of all variables mentioned would require 2 experiments (before, after [redacted]) x 2 models x 2 temperatures x 3 stages of Alzheimer's x 12 animals x 3 groups ([redacted] and 2 controls) = 864 animals. (Only when no clear differences are found, 2 extra [redacted] need to be examined: 864 additional animals)
- b. Proteomics analysis ([redacted]). Derived from a., here we will include the best model at the [redacted] and optimal time of testing. This requires 2 interventions x 1 model x 1 temperature x 1 stage of Alzheimer's x 8 animals x 3 groups ([redacted] and 2 controls)= 48 animals.
- c. Molecular markers, affected by [redacted], measured by immunohistochemistry (IHC; anesthetized perfused animals). Derived from a., here we will include the best model at the optimal temperature and optimal time of testing. This requires 2 interventions x 1 model x 1 temperature x 1 stage of Alzheimer's x 6 animals x 3 groups = 36 animals.
- d. [redacted] are examined in a similar group as b. at an n=12, thus requiring 2 interventions x 1 model x [redacted] x 1 stage of Alzheimer's x 12 animals x 3 groups ([redacted] and 2 controls)= 72 animals.
- e. If hibernation mitigates Alzheimer's disease, we would want to obtain samples reflecting the (molecular) transition from [redacted]. To this end, we will obtain 15 samples from the optimal model at [redacted] on the [redacted], monitored by [redacted]. Animals need to be euthanized both to obtain [redacted]. Thus: 1 model x 2 collection methods x 15 = 30 animals.

In total, phase II requires 1050 animals of which 370 are [redacted] (or 1914 when testing at extra temperatures is necessary of which 710 [redacted].

In phase III, mice conditionally knock-out for [redacted] [redacted] will be examined. We anticipate 8 groups to be tested: 3 strains of conditionally knock-out animals inbred with Alzheimer's mice, 3 non-tamoxifen treated controls and 2 tamoxifen controls. The following groups are studied:

- a. [redacted]. At the optimal model and [redacted] at 2 stages of Alzheimer's as derived from Ia-d, we will examine IHC and proteomics requiring 1 model x [redacted] x [redacted] of Alzheimer's x 14 (6IHC, 8 proteomics) animals x 2 conditions (both hibernating and control animals) x 8 groups = 448 mice.
- b. [redacted]. We will test early and late intervention in 1 model at the optimal [redacted] of Alzheimer's. This requires 2 interventions x 1 model x [redacted] of Alzheimer's x 14 animals x 3 groups (WFF and 2 controls) x 8 groups = 1344 mice.

In total, phase III requires 1792 animals of which 672 animals.

In total 3138 animals are requested, from which 1190 animals are allocated to [redacted]. We estimate a success rate of [redacted] in both models at 80%, requiring an additional 298 animals. Thus a total maximum of 3436 animals is required. Of note is that this represents the total amount of animals should all of the conditions outlined be covered.

---

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

In phase II we aim to test the effectiveness of [redacted]

Numbers of animals are based on the minimum number of animals used in previous comparable research that could lead to statistical relevant analyses.

## B. The animals

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

Species: mus musculus, C57BL/6; [redacted].

Origin: Harlan / Charles River, or own breeding

---

Estimated numbers: 3436 animals  
Life stages: adults, 3-8 months of age, males

We use male mice, [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.

Reduction and refinement: [REDACTED] are performed in the same animals. [REDACTED], IHC of certain markers and proteomics, require a separate cohort of animals as cell [REDACTED] parameters are affected by previous [REDACTED]. Other organs will be provided to other research groups/PhD's to be examined.

Replacement is not possible given the complexity of developing Alzheimer's Disease [REDACTED] has to be tested in order to identify [REDACTED] rescue related to [REDACTED]

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

The procedures will be performed in quiet environments to minimize fear and stress when animals are not under general anesthesia. Animals will be group housed for as long as possible. During surgical procedures, anesthetic depth is frequently checked and if needed the anesthetic dose is adjusted. Post-testing anxiety will be attenuated by recovery in a quiet area in their home cage. Since anesthesia interferes with some of the experimental outcomes and it is necessary to sacrifice animals by decapitation/cervical dislocation instead, however it has been shown that when performed properly animal suffering should not be higher than when they are put under sedation. Before perfusion animals will be put under full sedation, which is regularly checked.

[REDACTED] - is performed by expert personnel to reduce the amount of fear, although this is inherent of the procedure. [REDACTED]

Animals will be handled regularly to enable euthanization by decapitation/cervical dislocation without inducing stress. All testing and handling of the animals will be performed by experienced and trained personnel.

## 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.

No literature can be found on testing hibernation as a therapeutic intervention for Alzheimer's Disease

## 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.

Surgery to [REDACTED] be performed under general anesthesia with isoflurane. Just prior to the closure of wounds, animals receive a s.c. injection with carprofen. Animals will be monitored after surgery to insure no unnecessary suffering or adverse effects appear.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Stress, particular in response to behavioral testing

Explain why these effects may emerge.

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

Ensure absence of additional stressful events through handling by expert personnel, stress levels will be monitored and overall animal welfare will be monitored to ensure the stress does not exceed stress levels expected for the behavioral tests (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.

Major changes in food and water intake, behavior and general condition (fur, movements) or an excessive weight loss, exceeding the normal weight loss when switching from [REDACTED]

[REDACTED] in addition to the above: wound healing problems, signs of discomfort on handling.

Indicate the likely incidence.

Incidence is likely very low or absent, as mice normally endure [REDACTED] in mouse have been found so far.

### 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').

[REDACTED] - moderate

[REDACTED] - mild

[REDACTED] - mild

\* Single housing: mild

\* [REDACTED] mild

\* [REDACTED] : moderate

\* [REDACTED] : moderate

\* [REDACTED] : moderate

Euthanasia under anesthesia with/without perfusion - no recovery

[REDACTED] - no recovery

[REDACTED] - mild, no recovery

Overall this leads to the following:

30%: mild (Phase I: 2-3 times [REDACTED] - termination under anesthesia)

70%: moderate (Phase II: [REDACTED] tests)

PM: Alzheimer mouse models display increased mortality at young age. As we use animals older [REDACTED], we did not take this into account in this appendix.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

In order to obtain organs for electrophysiological, molecular and IHC analysis.

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

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



Yes

## Appendix

### 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](http://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'.	10500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		2	Effectiveness of ██████████ Alzheimer's disease models

*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.

Alzheimer's disease is one of the most prevalent chronic neurodegenerative diseases, characterized by memory loss, and disturbances of speech, visiospatial function, planning and judgment. Apart from loss of neurons, [REDACTED] inflammation, oxidative stress and finally loss [REDACTED].

[REDACTED] processes still remain elusive, and therapy is mainly symptomatic.

In this appendix we explore whether [REDACTED] represent interesting targets to protect the brain from Alzheimer's disease and test the efficacy of a novel class of [REDACTED] in stressed cells.

This project aims to investigate (1) the importance of the [REDACTED] Alzheimer's disease. Thus we aim to study [REDACTED] Alzheimer's models and to test the efficacy of pharmacological intervention by oral treatment with [REDACTED]

To this end, the following mouse Alzheimer's models will be used:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

These mouse models have been used before in our institution, using both the analysis of [REDACTED] and molecular analysis. Moreover, efficacy of compounds has been tested prior in these models. Finally, we expect that compounds can be oral administered, which makes testing in the (longer duration) J20 and APP/PS1 model highly feasible.

Primary outcome measures constitute:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

The project constitutes 2 phases:

1. testing of [REDACTED] Alzheimer's models
2. if effective, exploration of the involvement of [REDACTED] [REDACTED]

---

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

---

Alzheimer models:

[REDACTED]

All models are operational in our facilities with appropriate conditions and expert technical knowledge and skills are available to examine [REDACTED] in collaboration with partners on the project, [REDACTED]

Compound testing:

Animals models are orally treated by administration via the food.

[REDACTED]

[REDACTED] tests are performed in the models.

[REDACTED]

Euthanization of mice:

Animals are sacrificed by [REDACTED] and subsequent harvesting of other

[REDACTED], (2) induction of anesthesia inevitably produces considerable stress (both by smelling of the volatile anesthetic and in the following excitation phase), which releases stress hormones also influencing [REDACTED]. In addition, [REDACTED] suggest that animal welfare is unaffected by [REDACTED] to euthanization under anesthesia [10]. Animals will be handled regularly to enable stress free cervical dislocation.

We expect to test vehicle and 3 compounds in each model and use [REDACTED] [REDACTED] as a positive control (i.e. 5 interventions). Hence the initial phase comprises 5 interventions x 3 models x 10 animals = 150 animals. In addition, in the second phase we expect to test 2 compounds in comparison to vehicle and [REDACTED] [REDACTED] (total 4 interventions) in 2 models in 3 strains of mice conditionally knock-out for the various [REDACTED] [REDACTED] or other genes and appropriate controls (one per knockout). This part thus comprises 4x2x6x10= 480 animals.

In total the project requires 630 animals.

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

We aim both for the testing of effectiveness of interventions and for the relation between [REDACTED]. Because of the second aim, a slightly higher number of animals per group is needed (10 animals) than would be needed to compare compounds (7 animals), as used in previous comparable research that could lead to statistical relevant analyses.

#### **B. The animals**

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

Species: mus musculus, C57BL/6, [REDACTED].  
Origin: [REDACTED]  
Estimated numbers: 120 animals, males  
Life stages: adults.

We use male mice, as gender differences in development of [REDACTED] in transgenic mice are known, and because previous experiments serving as reference were performed in male mice, [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.

Reduction and refinement: [REDACTED] Alzheimer's. [REDACTED]. Other organs will be made available to other research projects.

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

The procedures will be performed in quiet environments to minimize fear and stress when animals are not under general anesthesia. During surgical procedures, anesthetic depth is frequently checked and if needed the anesthetic dose is adjusted. Postoperative pain and suffering will be attenuated by administration of carprofen that is given to all animals during the surgical procedure as standard care. The mice will recover quietly and will be monitored closely in the postoperative phase. When there are signs of postoperative pain during their stay in the animal housing accommodation, carprofen will be administered subcutaneously.

[REDACTED]  
Animals will be handled regularly to enable euthanization by cervical dislocation without inducing stress.

### 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.

We are sure that no one has determined the efficacy of our propriety compounds in these models.

### 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.

Just prior to the closure of wounds, animals receive a s.c. injection with carprofen.

#### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

Stress, particular in response to

Explain why these effects may emerge.

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

Ensure absence of additional stressful events through handling by expert personnel.

#### **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.

Wound healing disturbances, major changes in food and water intake, behavior and general condition (fur, movements) or a weight loss exceeding 15% in 3 days post surgery.

Indicate the likely incidence.

Incidence is likely very low or absent. any sign of negative effects. None of the listed symptoms were found.

#### **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').

33%: Moderate - termination under anesthesia)

66%: mild - termination under anesthesia)

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Obtain organs for molecular analysis and to study biodistribution of the drug.

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

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

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RUG code **8040**)
2. Titel van het project: **Brain protective strategies using hibernation and hibernation-derived** [REDACTED]
3. Titel van de NTS : **Preventie van de ziekte van Alzheimer door winterslaap en winterslaap-afgeleide stoffen**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: **DEC-RUG**
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon : [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **03-12-2016**
  - aanvraag compleet: **03-12-2016**
  - in vergadering besproken: **10-12-2016**
  - anderszins behandeld : **27-01-2016, 08-02-2016**
  - termijnonderbreking(en) van / tot : **16-12-2015 tot 22-01-2016, 27-01-2016 tot 02-02-2016**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **22-01-2016, 02-02-2016**
  - advies aan CCD: **16-02-2016**
7. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **16-12-2015, 27-01-2016**

- Strekking van de vraag / vragen: **De oorspronkelijk ingediende aanvraag omvatte vijf appendices, alle gericht op de effecten van winterslaap en winterslaap-afgeleide stoffen op**

**ziekte van Alzheimer. Ook werd verzocht de dieraantallen duidelijker te onderbouwen en – waar mogelijk – go/no go momenten dan wel faseringen aan te brengen.**

- Datum antwoord: **22-01-2016, 02-02-2016**

- Strekking van het (de) antwoord(en): **De aanvrager heeft de adviezen volledig gevolgd wat geresulteerd heeft in een aangepaste hoofdaanvraag met twee appendices. Dieraantallen zijn nauwkeurig gevalideerd, faseringen zijn aangegeven.**

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: **ja**

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

- Aard expertise

- Deskundigheid expert

- Datum verzoek

- Strekking van het verzoek

- Datum expert advies

- Expert advies

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet): **ja**

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag: **ja**

3. De DEC is competent om hierover te adviseren: **ja**

4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: **n.v.t.**

## **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:

x uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **ja**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **substantieel** belang
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project: **ja**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd: **geen bijzonderheden**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geëvalueerd: **ja**
7. Er zijn **geen** methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven: **ja, door waar mogelijk [REDACTED] uit te voeren met (weefsel van) hetzelfde dier.** Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat: **ja**. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt: **de aanvrager heeft op zeer heldere wijze de fasering en de te behalen milestones bij elke fase aangegeven**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd: **ja**. Er is **geen** sprake van belangwekkende milieueffecten
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd: **ja**.

## **D. Ethische afweging**

Waar de mechanismen die bij wisselende episoden van slapen (torpor) en (kort) ontwaken tijdens winterslaap een rol spelen, tot het begin van deze eeuw nagenoeg onbekend waren, heeft het onderzoek van de laatste jaren een geheel nieuwe fysiologie en farmacologie van de onderliggende processen, zowel op functioneel als op moleculair niveau, aan het licht gebracht. Gebleken is dat de orgaanschade die tijdens de torpor-fase ontstaat – en die in belangrijke mate ook bij de vroege fase van de ziekte van Alzheimer is vastgesteld – tijdens de daaropvolgende waakfase zeer snel herstelt. Deze ontwikkeling is mede toe te schrijven aan wetenschappelijk onderzoek met muizen. Het voorgestelde onderzoek past in deze lijn.

Het onderhavige project exploreert in muizenmodellen van de ziekte van Alzheimer [REDACTED]

Het project is zorgvuldig geconcipeerd en is goed navolgbaar, is duidelijk gefaseerd opgezet met milestone-momenten, en zeer precies is aangegeven welke technieken worden toegepast. Ook de dieraantallen zijn bij elke fase nauwkeurig verantwoord.

Mede op basis van gepubliceerd vooronderzoek en de track-record van deze onderzoeksgroep, die internationaal een leidende positie inneemt, schat DEC-RUG de slaagkans van dit project hoog in.

De DEC realiseert zich dat een deel van de dieren tot ernstig ongerief zal ondergaan. Zij heeft dat meegenomen in haar ethische afweging. DEC-RUG concludeert alles afwegende dat uitvoering van het onderzoek ethisch verantwoord is vanwege een combinatie van 1) het maatschappelijk belang van voortgang in het Alzheimer-onderzoek, 2) de kans op wetenschappelijk succes van dit project plus 3) de zorgvuldige wijze waarop naleving van de 3 V's is verantwoord.

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is unaniem door de DEC genomen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD105002016427

**Bijlagen**

1

Datum 18 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016427. 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.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500  
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████  
KvK-nummer: 1179037  
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan ██████████  
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN  
IBAN: NL80ABNA0446049352  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 april 2016  
Geplande einddatum: 1 april 2021  
Titel project: Brain protective strategies using hibernation and hibernation-derived [REDACTED]  
Titel niet-technische samenvatting: Preventie van de ziekte van Alzheimer door winterslaap en winterslaap-afgeleide stoffen  
Naam DEC: DEC-RUG  
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1187,-  
De leges voldoet u: via eenmalige incasso

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: GRONINGEN

# Format DEC-advies

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

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RUG code **8040**)
2. Titel van het project: **Brain protective strategies using hibernation and hibernation-derived** [REDACTED]
3. Titel van de NTS : **Preventie van de ziekte van Alzheimer door winterslaap en winterslaap-afgeleide stoffen**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: **DEC-RUG**
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon : [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **03-12-2016**
  - aanvraag compleet: **03-12-2016**
  - in vergadering besproken: **10-12-2016**
  - anderszins behandeld : **27-01-2016, 08-02-2016**
  - termijnonderbreking(en) van / tot : **16-12-2015 tot 22-01-2016, 27-01-2016 tot 02-02-2016**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **22-01-2016, 02-02-2016**
  - advies aan CCD: **16-02-2016**
7. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **16-12-2015, 27-01-2016**

- Strekking van de vraag / vragen: **De oorspronkelijk ingediende aanvraag omvatte vijf appendices, alle gericht op de effecten van winterslaap en winterslaap-afgeleide stoffen op diverse,**

**de aanvraag te concentreren op de ziekte van Alzheimer. Ook werd verzocht de dieraantallen duidelijker te onderbouwen en – waar mogelijk – go/no go momenten dan wel faseringen aan te brengen.**

- Datum antwoord: **22-01-2016, 02-02-2016**

- Strekking van het (de) antwoord(en): **De aanvrager heeft de adviezen volledig gevolgd wat geresulteerd heeft in een aangepaste hoofdaanvraag met twee appendices. Dieraantallen zijn nauwkeurig gevalideerd, faseringen zijn aangegeven.**

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: **ja**

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

- Aard expertise

- Deskundigheid expert

- Datum verzoek

- Strekking van het verzoek

- Datum expert advies

- Expert advies

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet): **ja**

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag: **ja**

3. De DEC is competent om hierover te adviseren: **ja**

4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: **n.v.t.**

## **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:

x uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **ja**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **substantieel** belang
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project: **ja**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd: **geen bijzonderheden**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd: **ja**
7. Er zijn **geen** methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven: **ja, door waar mogelijk** [REDACTED] **hetzelfde dier.** Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat: **ja**. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt: **de aanvrager heeft op zeer heldere wijze de fasering en de te behalen milestones bij elke fase aangegeven**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd: **ja**. Er is **geen** sprake van belangwekkende milieueffecten
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd: **ja**.

## **D. Ethische afweging**

**Waar de mechanismen die bij wisselende episoden van slapen (torpor) en (kort) ontwaken tijdens winterslaap een rol spelen, tot het begin van deze eeuw nagenoeg onbekend waren, heeft het onderzoek van de laatste jaren een geheel nieuwe fysiologie en farmacologie van de onderliggende processen, zowel op functioneel als op moleculair niveau, aan het licht gebracht. Gebleken is dat de orgaanschade die tijdens de torpor-fase ontstaat – en die in belangrijke mate ook bij de vroege fase van de ziekte van Alzheimer is vastgesteld – tijdens de daaropvolgende waakfase zeer snel herstelt. Deze ontwikkeling is mede toe te schrijven aan wetenschappelijk onderzoek met muizen. Het voorgestelde onderzoek past in deze lijn.**

**Het onderhavige project exploreert in muizenmodellen van de ziekte van Alzheimer** [REDACTED]

**Het project is zorgvuldig geconcipeerd en is goed navolgbaar, is duidelijk gefaseerd opgezet met milestone-momenten, en zeer precies is aangegeven welke technieken worden toegepast. Ook de dieraantallen zijn bij elke fase nauwkeurig verantwoord.**

**Mede op basis van gepubliceerd vooronderzoek en de track-record van deze onderzoeksgroep, die internationaal een leidende positie inneemt, schat DEC-RUG de slaagkans van dit project hoog in.**

**De DEC realiseert zich dat een deel van de dieren tot matig ongerief zal ondergaan. Zij heeft dat meegenomen in haar ethische afweging. DEC-RUG concludeert alles afwegende dat uitvoering van het onderzoek ethisch verantwoord is vanwege een combinatie van 1) het maatschappelijk belang van voortgang in het Alzheimer-onderzoek, 2) de kans op wetenschappelijk succes van dit project plus 3) de zorgvuldige wijze waarop naleving van de 3 V's is verantwoord.**

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is unaniem door de DEC genomen.



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
9713 AV GRONINGEN



**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  
AVD105002016427  
**Bijlagen**  
1

Datum 5 april 2016  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 17 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Brain protective strategies using hibernation and hibernation-derived" met aanvraagnummer AVD105002016427. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Brain protective strategies using hibernation and hibernation-derived" starten. De vergunning wordt afgegeven van 5 april 2016 tot en met 1 april 2021. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

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 16 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 7 maart 2016 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC

is verzocht om een verschrijving met betrekking tot de ongerief classificatie in de ethische afweging van haar advies te corrigeren. Er is een aangepast DEC advies naar de CCD gestuurd, zonder gevolgen op het besluit. In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

### **Bezwaar**

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

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

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

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

### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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



## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan [REDACTED]

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 5 april 2016 tot en met 1 april 2021, voor het project "Brain protective strategies using hibernation and hibernation-derived [REDACTED] met aanvraagnummer AVD105002016427, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. In aanvulling op het advies van de DEC stelt de CCD twee voorwaarden.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 februari 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 februari 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 februari 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 februari 2016, ontvangen op 19 februari 2016, en aangepast op 7 maart 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Effectiveness of hibernation in mouse Alzheimer's disease	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / C57BL/6; [REDACTED]	3436	30,00% Licht 70,00% Matig	
Effectiveness of [REDACTED] in mouse Alzheimer's disease models	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / C57BL/6; [REDACTED]	630	33,00% Matig 66,00% Licht	

### Voorwaarden

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

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

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

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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

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

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 5 april 2016 15:53  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** terugkoppeling besluit op aanvraag AVD105002016427

Geachte DEC-RUG,

Op 17-02-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Brain protective strategies using hibernation and hibernation-derived [REDACTED]' met aanvraagnummer AVD105002016427.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

Op verzoek van de CCD heeft u een verschrijving in uw advies aangepast.

Wij danken u voor uw advies en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug. De CCD heeft besloten de vergunning te verlenen. Er zijn geen specifieke voorwaarden aan de vergunning verbonden.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen. De aanvrager en de verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

We hopen u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)**





## 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](http://www.zbo-ccd.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   11500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Naam instelling of organisatie</td> <td>UMC Utrecht</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">KvK-nummer</td> <td>3 0 2 4 4 1 9 7</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7									
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Straat en huisnummer</td> <td>Instantie voor Dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Postbus</td> <td>12007</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Postcode en plaats</td> <td>3501AA Utrecht</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">IBAN</td> <td>NL27INGB0000425267</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Universiteit Utrecht</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn																
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.	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Functie</td> <td>PhD onderzoeker</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	PhD onderzoeker		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	PhD onderzoeker																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 . 0 1 . 2 0 1 6
- Einddatum 0 1 . 0 1 . 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Smart coatings for orthopedic implants
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Slimme coatings voor orthopedische implantaten
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.187,00 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
- Bijlage dierproef 1, bijlage dierproef 2

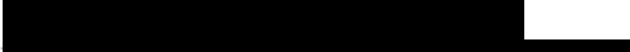
## 6 Ondertekening


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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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


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

Naam 

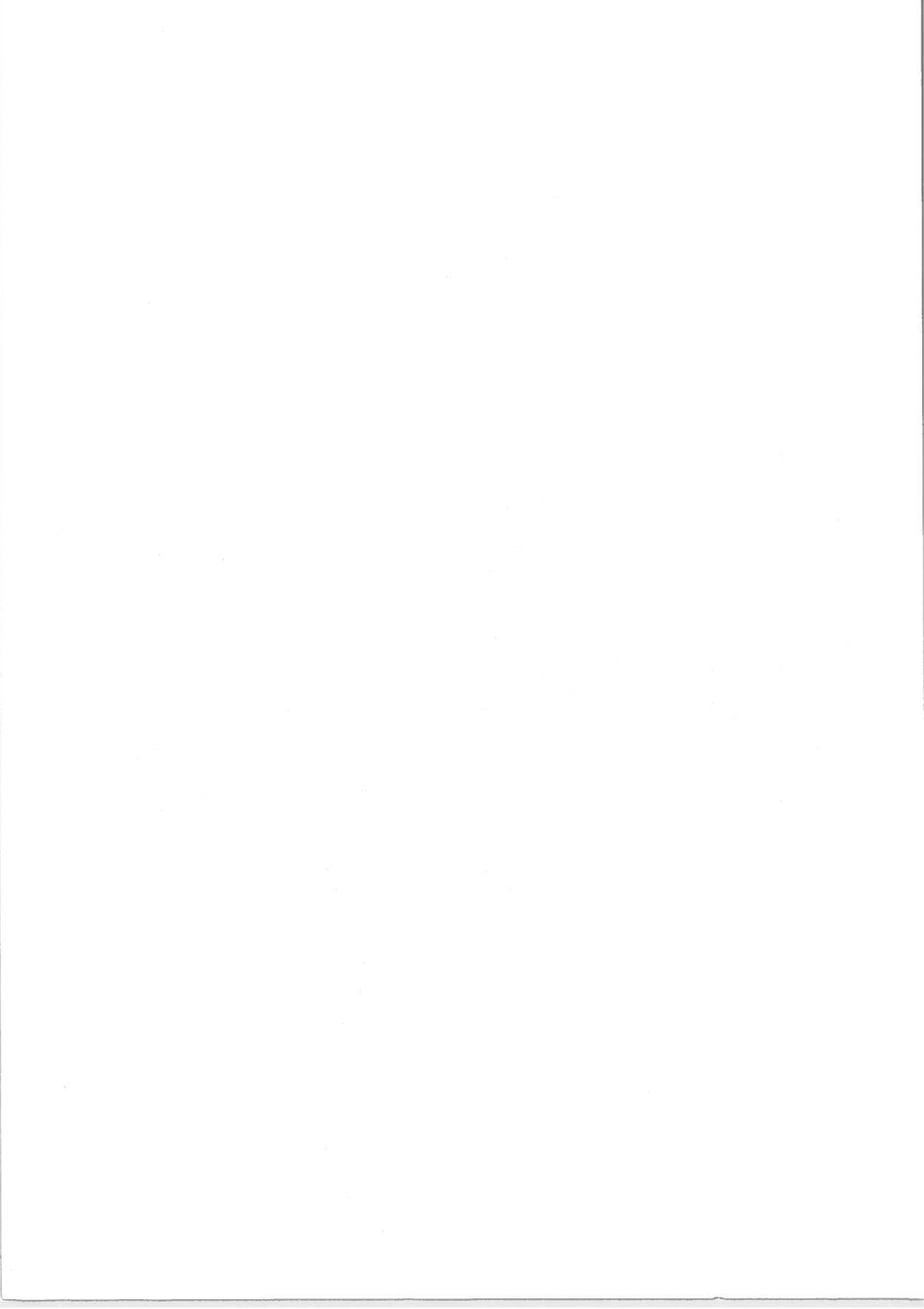
Functie 

Plaats Utrecht

Datum 19-12-2016

Handtekening 







2

## 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.zbo-ccd.nl](http://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'.
- 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 animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

### 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.

Although several kinds of implants are approved for their use in orthopedic surgeries, failure still occurs in 10% of the cases [1] mainly due to 1) deficient integration of the implant with the surrounding bone and due to 2) implant-associated infections. These processes are highly interdependent. The development of simple and stable implants having optimal bone-stimulating and bacterial-killing properties is therefore of scientific and clinical significance [1, 2].

According to clinical observations, an implant may provide a surface at which bacteria escape immune surveillance. As such, bacteria can form a biofilm (i.e. a combination of bacteria and secreted polymers) on the implant surface, which subsequently protects them from clearance by the immune system and treatment with antibiotics [3]. This results in a chronic infection of the implant. The infection also impairs the adhesion of bone cells, thus reducing the bone-implant integration. The current treatment of patients with antibiotics furthermore has some limitations, such as local tissue damage [3] and the risk of antibiotic resistance [4].

In our *in vitro* research, we design and test coatings with bone-stimulating and bacterial-killing properties. For this purpose, we use complex surface treatments of materials (e.g. nanotubes) which can be loaded with inorganic particles (e.g. silver or zinc) [5,6,7]. Furthermore, bone-stimulating factors such as bone morphogenetic proteins or inflammation-associated factors can be incorporated in the coatings [8,9]. As part of the latter, we have shown that bacterial-derived factors (e.g. proteins, lipoproteins or teichoic acids) have bone-stimulating properties [10, 11]. To test whether these coatings can indeed prevent biofilm formation and improve bone integration, this study aims to test the efficacy of different coatings in the context of the immune system in animal models. Both metal and calcium phosphate ceramic implants will be tested, as they are both interesting materials for orthopedic applications.

Recently, there has been a huge progress in the fabrication methods of porous implants, for instance by the advances in additive manufacturing techniques [1,2,12-15]. This has opened up new paths to tackle implant-associated infections by making well-designed implant coatings with precise architecture. For metal implants, titanium nanotubes (NTs) coatings have been demonstrated to promote adhesion and matrix production by bone cells *in vitro* [16] and bone-implant integration *in vivo*. In addition, these NTs constitute an excellent drug-loading and delivering platform [17,18,19]. Using the NTs, the loading capacity and the release rate of the drugs can be easily varied by changing the structural parameters. The NTs can be further modified in a number of ways to enhance their bacterial-killing performance. First, to further fine-tune the delivery of incorporated inorganic nanoparticles (e.g. zinc, silver) from the coatings, polymeric hydrogels can act as a reservoir in the NTs for their sustained release [20, 21]. Second, dual-purpose implants – i.e. implants that enhance stimulate bone formation and kill

bacteria- have recently gained more interest [12,13]. We hypothesize that the combination of a bacterial-killing agent with a bone-stimulating growth factor would enable us to control the dose and the timing of these components for a longer period [22,23]. We will include various bone-stimulating growth factors (e.g. bone morphogenetic proteins) and inflammation-associated compounds (e.g. proinflammatory cytokines or bacterial-derived factors) [8,9,10,11] known as beneficial for bone formation. We would therefore like to test if the coating of materials with these compounds is a clinically feasible strategy to improve bone formation. These biomolecule coatings can not only improve the integration of implants with surrounding bone, but they may also be used in many other bone regeneration applications as a replacement of the current bone grafts [24].

## REFERENCES

- [1] Amin Yavari S, van der Stok J, Chai YC, Wauthle R, Tahmasebi Birgani Z, Habibovic P, et al. Bone regeneration performance of surface-treated porous titanium. *Biomaterials* 2014;35:6172-81.
- [2] Amin Yavari S, Chai YC, Böttger AJ, Wauthle R, Schrooten J, Weinans H, et al. Effects of anodizing parameters and heat treatment on nanotopographical features, bioactivity, and cell culture response of additively manufactured porous titanium. *Materials Science and Engineering: C* 2015;51:132-8.
- [3] Hickok NJ, Shapiro IM. Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012;64:1165-76.
- [4] Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2005;7-11.
- [5] Jin G, Qin H, Cao H, Qiao Y, Zhao Y, Peng X, et al. Zn/Ag micro-galvanic couples formed on titanium and osseointegration effects in the presence of *S. aureus*. *Biomaterials* 2015;65:22-31.
- [6] Necula BS, Fratila-Apachitei LE, Zaat SAJ, Apachitei I, Duszczuk J. In vitro antibacterial activity of porous TiO<sub>2</sub>-Ag composite layers against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomaterialia* 2009;5:3573-80.
- [7] Qin H, Cao H, Zhao Y, Zhu C, Cheng T, Wang Q, et al. In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials* 2014;35:9114-25
- [8] Yun YR, Jang JH, Jeon E, Kang W, Lee S, Won JE, Kim HW, Wall I. Administration of growth factors for bone regeneration. *Regen Med.* 2012 May;7(3):369-85.
- [9] Mountziaris PM, Spicer PP, Kasper FK, Mikos AS. *Tissue Eng Part B Rev.* Harnessing and modulating inflammation in strategies for bone regeneration. 2011 Dec;17(6):393-402
- [10] Croes M, Oner FC, Kruyt MC, Blokhuis TJ, Bastian O, Dhert WJ, Alblas J. Proinflammatory Mediators Enhance the Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells after Lineage Commitment. *PLoS One.* 2015 Jul 15
- [11] Croes M, Loozen L, Kruyt MC, Yuan H, Dhert WJ, Oner FC, Alblas J, Local inflammation and bone formation in a new translational animal model. Unpublished.
- [12] Amin Yavari S, Wauthle R, van der Stok J, Riemsdag AC, Janssen M, Mulier M, et al. Fatigue behavior of porous biomaterials manufactured using selective laser melting. *Materials Science and Engineering: C* 2013;33:4849-58.
- [13] Wauthle R, Van der Stok J, Yavari SA, Van Humbeeck J, Kruth J-P, Zadpoor AA, et al. Additively manufactured porous tantalum implants. *Acta Biomaterialia* 2014.
- [14] Ahmadi SM, Campoli G, Amin Yavari S, Sajadi B, Wauthle R, Schrooten J, et al. Mechanical behavior of regular open-cell porous biomaterials made of diamond lattice unit cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2014;34:106-15.
- [15] Amin Yavari S, Ahmadi SM, van der Stok J, Wauthle R, Riemsdag AC, Janssen M, et al. Effects of bio-functionalizing surface treatments on the mechanical behavior of open porous titanium biomaterials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2014;36:109-19.

- [16] Popat KC, Leoni L, Grimes CA, Desai TA. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. *Biomaterials* 2007;28:3188-97.
- [17] Gao A, Hang R, Huang X, Zhao L, Zhang X, Wang L, et al. The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts. *Biomaterials* 2014;35:4223-35.
- [18] Mei S, Wang H, Wang W, Tong L, Pan H, Ruan C, et al. Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. *Biomaterials* 2014;35:4255-65.
- [19] Jin G, Qin H, Cao H, Qiao Y, Zhao Y, Peng X, et al. Zn/Ag micro-galvanic couples formed on titanium and osseointegration effects in the presence of *S. aureus*. *Biomaterials* 2015;65:22-31.
- [20] Nair LS, Laurencin CT. *Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. Tissue engineering I: Springer; 2006. p. 47-90.*
- [21] Kretlow JD, Young S, Klouda L, Wong M, Mikos AG. Injectable biomaterials for regenerating complex craniofacial tissues. *Advanced Materials* 2009;21:3368-93.
- [22] Wenke JC, Guelcher SA. Dual delivery of an antibiotic and a growth factor addresses both the microbiological and biological challenges of contaminated bone fractures. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2011;8:1555-69.
- [23] Guelcher SA, Brown KV, Li B, Guda T, Lee B-H, Wenke JC. Dual-purpose bone grafts improve healing and reduce infection. *Journal of orthopaedic trauma* 2011;25:477-82.
- [24] Gupta A, Kukkar N, Sharif K, Main BJ, Albers CE, El-Amin Iii SF. Bone graft substitutes for spine fusion: A brief review. *World J Orthop.* 2015 Jul 18;6(6):449-56

---

### 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 goal of this project is to test multifunctional implant coatings which are designed to facilitate bone integration and bacterial-killing. These coatings are developed and tested as part of another in vitro project.

As a first subgoal, we would like to determine if an implant coating consisting of inorganic nanoparticles (e.g. silver and zinc) in combination with nanotubes is a clinically feasible strategy for bone-implant integration and bacterial-killing purposes. In these study, the effect of the release-rate of these inorganic nanoparticles will also be assessed. The inorganic nanoparticles can be combined with bone-stimulating growth factors (e.g. bone morphogenetic proteins) to enhance the integration of the implants with existing bone.

As a second subgoal, we would like to test whether the coating of materials (i.e. metals or calcium phosphates) with inflammation-associated factors (e.g. proinflammatory cytokines or bacterial-derived compounds) is a clinically feasible strategy to enhance their bone-stimulating properties. The coatings can be used to induce bone regeneration as part of a bone substitute or to improve the implant-bone integration of

implants.

We believe our objective is achievable, as we have already identified a number of bacterial-killing and bone-stimulating factors *in vitro* [1,2,3,4]. However, a 5 year time period seems to be realistic, as some manufacturing techniques (i.e. the layer-by-layer release system and hydrogel coating method) have to be optimized and tested in vitro. We believe we have a strong interdisciplinary team of researchers: engineers working on the complex coatings (collaboration with TU Delft), biologists working on stem cells and bone regeneration, and clinicians with knowledge of the translational aspects. Furthermore, our department has experience with the animal models described in this proposal and the required analyses methods. For the rat infection model, we will perform a pilot study to first determine the minimal inoculation dose of *Staphylococcus aureus*. For the rabbit infection model, these dose response studies have already been performed within the same experimental conditions (location, type of animals, origin of animals, and bacterial strain). The animals models used in this project (implant infection model and spinal fusion model) are well described in the literature [5,6] .

#### REFERENCES

- [1] Amin Yavari S, Ahmadi SM, van der Stok J, Wauthle R, Riemslag AC, Janssen M, et al. Effects of bio-functionalizing surface treatments on the mechanical behavior of open porous titanium biomaterials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2014;36:109-19.
- [2] Popat KC, Leoni L, Grimes CA, Desai TA. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. *Biomaterials* 2007;28:3188-97.
- [3] Croes M, Oner FC, Kruyt MC, Blokhuis TJ, Bastian O, Dhert WJ, Alblas J. Proinflammatory Mediators Enhance the Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells after Lineage Commitment. *PLoS One*. 2015 Jul 15
- [4] Croes M, Loozen L, Kruyt MC, Yuan H, Dhert WJ, Oner FC, Alblas J, Local inflammation and bone formation in a new translational animal model. Unpublished.
- [5] Reizner, JG Hunter, NT O'Malley, RD Southgate, EM Schwarz, SL Kates. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur Cell Mater*. 2014 Mar 25;27:196-212.
- [6] Drespe et al. Animal models for spinal fusion. *Spine J*. 2005.

### 3.3 Relevance

---

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

---

One of the most important challenges that orthopedic surgeons face, is to minimize infection of implants during and after surgery, while stimulating the integration of the implant with the bone. In 10% of the cases however, implant failure still occurs [1]. It is thought that the prevention or successful treatment of implant-related infections can help hundreds of thousands of patients each year. These patients face revision surgery due to implant loosening and/or implant infection, causing much pain, disability or even death. Apart from this, costly revision surgeries constitute an economical burden on society.

Furthermore, growth factors such as the bone morphogenetic proteins [2], proinflammatory cytokines [3] or and bacterial-derived compounds [4,5] can stimulate new bone formation and therefore may be used as a coating to improve the bone formation around implants. Similarly, these same factors could be used in coatings to stimulate the bone formation around metal or ceramic implants in regenerative strategies (e.g. spinal fusion or non-healing fractures) [6]. Considering that bone is the most transplanted tissue after the transfusion of blood, there is

a great need for new bone substitutes [7].

We hypothesize that a smart implant coating could prevent bacterial colonization, enhance bone integration and stimulate bone regeneration.

The animal studies can also provide us new scientific knowledge: the in vivo performance of these coatings can provide information on the ability of bacteria to produce biofilms on different surfaces. Furthermore, it can elucidate how bacteria can negatively affect the bone tissue. If bone-stimulating compounds are identified, this can give insight in the pathways of bone formation that should be targeted in future research.

## REFERENCES

- [1] Amin Yavari S, van der Stok J, Chai YC, Wauthle R, Tahmasebi Birgani Z, Habibovic P, et al. Bone regeneration performance of surface-treated porous titanium. *Biomaterials* 2014;35:6172-81.
- [2] Yun YR, Jang JH, Jeon E, Kang W, Lee S, Won JE, Kim HW, Wall I. Administration of growth factors for bone regeneration. *Regen Med.* 2012 May;7(3):369-85.
- [3] Mountziaris PM, Spicer PP, Kasper FK, Mikos ASTissue Eng Part B Rev. Harnessing and modulating inflammation in strategies for bone regeneration. 2011 Dec;17(6):393-402
- [4] Croes M, Oner FC, Kruyt MC, Blokhuis TJ, Bastian O, Dhert WJ, Alblas J. Proinflammatory Mediators Enhance the Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells after Lineage Commitment. *PLoS One.* 2015 Jul 15
- [5] Croes M, Loozen L, Kruyt MC, Yuan H, Dhert WJ, Oner FC, Alblas J, Local inflammation and bone formation in a new translational animal model. Unpublished.
- [6] US Centers for Disease Control and Prevention: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/tissueTransplantsFAQ.html#d>
- [7] Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E: Bone substitutes: An update. *Injury* 2005Nov;36: S20-S27.

## 3.4 Research strategy

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

As part of another project, in vitro antibacterial and pro-osteogenic screening studies will be employed to find optimal dose and time co-delivery of inorganic nanoparticles (e.g. silver or zinc elements) or biological factors (e.g. bone morphogenetic proteins, proinflammatory cytokines or bacterial-derived factors) that can eradicate bacterial colonization and biofilm formation while stimulating the necessary bone formation for bone-implant integration.

Although bacterial killing can be studied in vitro, this does not always correlate with the clinical situation. Therefore, as part of the current project, our strategies should also be tested in the context of the immune system in animal models [1,2,3]. Similarly, we can identify possible bone-stimulating factors in vitro by studying their potential to differentiate stem cells into bone cells. However, as bone cannot be formed in an in vitro setting, the true bone-stimulating potential of our strategies should be tested in animal models.

An implant-related infection model is useful to demonstrate the efficacy of the material coatings in terms of bacterial killing and bone-implant integration [3]. We will induce an infection with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and insert a titanium implant to support colonization by these bacteria. The rat implant-infection model allows for more mechanistic studies, while the rabbit implant infection model allows for more clinically representative bacterial doses to be used together with the study of local and systemic signs of inflammation [4].

In contrary to the implant infection model, the spinal fusion model is particularly useful to demonstrate the efficacy of the material coatings as part of bone substitutes in terms of new bone formation [5]. As spinal fusion is the most common application for which bone grafts are used [6], it is logical to test the coatings in the same location from a translational point of view. This model is a better model to study de novo bone formation, whereas the implant model is a better model to study bone growth towards the material.

For both models, we would like to use rats and rabbits. Studies are first performed in rats, as there are more research tools (e.g. antibodies) available for the rat species allowing for more mechanistic studies. Subsequently, findings will be confirmed in rabbits. Literature suggests that the rabbit osteomyelitis model is superior than the rat model for translational research as their immune system is more comparable to that of humans [4,7,8]. Also, in the spinal fusion model, a direct comparison can be made between our coating and the golden standard (i.e. autologous bone grafting). Finally, slightly larger constructs can be tested in rabbits with more freedom of surface modifications.

## REFERENCES

- [1] McCabe, W. R., and T. L. Treadwell. 1986. In vitro susceptibility tests: correlations between sensitivity testing and clinical outcome in infected patients, p. 925-936. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- [2] Curtis, F. R., and A. E. Wildnson. 1958. A comparison of the in vitro sensitivity of gonococci to penicillin with the results of treatment. *Br. J. Vener. Dis.* 34:70-78.
- [3] Gerber, A. U., and W. A. Craig. 1981. Worldwide clinical experience with cefoperazone. *Drugs* 22(Suppl. 1):108-118.
- [4] Reizner, JG Hunter, NT O'Malley, RD Southgate, EM Schwarz, SL Kates. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur Cell Mater.* 2014 Mar 25;27:196-212.
- [5] AM Riordan, R Rangarajan, JW Balts, WK Hsu, PA Anderson. Reliability of the Rabbit Postero-Lateral Spinal Fusion Model: A Meta-Analysis. *JOR* 2013
- [6] WG De Long, TA Einhorn, K Koval et al. Current concepts review: Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. *J Bone Joint Surg AM* 2007
- [7] Bosze, Z. and Houdebine, L.M. (2006) Application of rabbits in biomedical research: a review. *World Rabbit Sci.* 14:1-14.
- [8] Dharmadhikari, A. and Nardell, E.A. (2008) What animal models teach humans about tuberculosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39:503-508.

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.

We intend to use rat and rabbit models of bone formation and implant-related infection. We will test the efficacy of a number of coatings which are developed and studied as part of another in vitro project.



In the model of implant-related infection, an implant is placed in the tibial cavity after inoculation of *S. aureus*. At a certain inoculation dosage, biofilm formation and chronic infection can be established. Both rat and rabbit models are well-validated for this purpose [1]. In our studies, we will monitor bacterial killing (bacterial survival/proliferation) and implant-bone integration (micro-CT imaging and histology). The inoculation dose in rats will be determined first in a pilot study. In an identical model in rabbits, an inoculation dose of  $10^5$  CFU with *S. aureus* has already been established to be optimal by our group (unpublished data).

Initial studies will be performed in rats. In these studies, we will assess:

- 1) different antimicrobial inorganic nanoparticles (including zinc and silver) in combination with nanotubes
- 2) feasibility of controlling the release-rate of the nanoparticles by adding a hydrogel layer in the nanotubes
- 3) testing the efficacy of a layer-by-layer design of an implant coating to simultaneously stimulate bone formation and bacterial killing

Subsequently, the most optimal conditions can be tested in the similar model in rabbits. In rabbits, large-size implants can be tested. Also, the inoculation dose of *S. aureus* is more representative of the clinical situation in rabbits than is in rats [2]. Finally, local and systemic effects of the implant coatings can be more easily tested in rabbits.

While the implant-related infection models can be used to study their effect both on bacterial killing and bone-implant integration, these are not functional models in which bone-stimulating coatings can be studied for the purpose of bone regeneration. To assess the bone-stimulating properties of biological or inorganic coatings, we intend to use the spinal fusion model as a second animal model [3, 4]. In this model, bone formation can be easily quantified by determining the fusion rate. The spinal fusion model better mimics a clinical situation where an excessive amount of de novo bone formation is required. The rat spinal fusion model allows for more mechanistic studies - due to the available research tools for the rat species - in combination with 3D imaging. For follow-up studies, rabbits are preferred as their immune system is more comparable to humans [5]. As such, mice and rats are relatively resistant to pro-inflammatory factors and bacterial compounds [6]. These factors candidates to be tested for their bone-stimulating properties.

## REFERENCES

- [1] Ma M, Kazemzadeh-Narbat M, Hui Y, Lu S, Ding C, Chen DDY, et al. Local delivery of antimicrobial peptides using self-organized TiO<sub>2</sub> nanotube arrays for peri-implant infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2012;100A:278-85.
- [2] Reizner, JG Hunter, NT O'Malley, RD Southgate, EM Schwarz, SL Kates. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur Cell Mater.* 2014 Mar 25;27:196-212.
- [3] SD Boden, GJ Martin, M Morone, JL Ugbo, L Titus, WC Hutton. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine.* 1999;24:320-327
- [4] IH Drespe et al. Animal models for spinal fusion. *Spine J.* 2005.
- [5] Copeland S, Warren HS, Lowry, SF, Calvano SE, Remick D. Acute Inflammatory Response to Endotoxin in Mice and Humans. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Jan; 12(1): 60-67
- [6] Jacquier V, Estellé, Schmaltz-Panneau B et al. Genome-wide immunity studies in the rabbit: transcriptome variations in peripheral blood mononuclear cells after in vitro stimulation by LPS or PMA-Ionomycin. *BMC Genomics* 2015, 16:26

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.

We can define the following phases in our project. The choice of the animal studies is determined by a number of go/no go moments.

Phase I, in rats (implant-related infection model): we will perform a pilot study first to determine the minimal *S. aureus* dose (CFU) necessary to get a reproducible implant-related infection. Currently, *S. aureus* ATCC 6538 is used for in vitro experiments and it is likely that this strain will also be used for the in vivo experiments. The range is based on literature and will be in the  $1 \times 10^2$  –  $1 \times 10^8$  CFU range [1].

Phase II, in rats (implant-related infection model): we will test inorganic nanoparticles (e.g. zinc and silver) using this implant infection model (as determined in phase I). Both the optimal delivery method and concentration of these nanoparticles is studied. We are currently in the process of identifying the efficacy of the nanoparticles in vitro.

Phase III, in rats (implant-related infection model): Go/no go moment. We are currently still developing the technology for the layer-by-layer design for the combined delivery of growth factors and bacterial killing compounds in an in vitro setting. The layer-by-layer coatings will only be tested in animals if they show a higher efficacy in vitro compared to single layer coatings. In these animal studies, we would like to test the optimal layer-by-layer design for bacterial killing and implant integration.

Phase IV, in rabbits (implant-related infection model): go/no go moment. Determine the efficacy of the optimal bacterial-killing and bone promoting coatings (as determined in Phases II and III) in rabbits. These studies will only be performed when inorganic nanoparticles (e.g. silver and zinc) or layer-by layer coatings show an efficacy in the rats. In the rabbits, local and systemic markers of inflammation can be studied. Also, slightly larger implants can be used which allow for more freedom in the surface modification which can be performed. For the rabbit infection model, we will use  $1 \times 10^5$  CFU *S. aureus*. A pilot study has previously been performed within our group (unpublished data). In this study, a range of *S. aureus* doses ( $10^2$  CFU to  $10^6$ ) were compared. The  $1 \times 10^5$  CFU dose resulted in a reproducible, local, chronic infection in the animals. This was shown to be the optimal concentration in previous dose-response studies performed by our group with the same bacteria in the same rabbit model.

Phase V, in rats (spinal fusion model): determine the in vivo efficacy of bone-promoting coatings for bone regenerative purposes in a functional spinal fusion model in rats.

Phase VI, in rabbits (spinal fusion model): go/no go moment. Determine the efficacy of bone-promoting coatings for bone regenerative purposes in a functional spinal fusion model in rabbits (as determined in Phase V). This study will only be performed when beneficial effects of the bone-promoting coatings are observed in the rats. In the rabbit model, a comparison can be made with the golden standard for bone grafting (autologous) bone. In addition, local and systemic inflammation markers will be studied.

REFERENCES

[1] Reizner, JG Hunter, NT O'Malley, RD Southgate, EM Schwarz, SL Kates. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. Eur Cell Mater. 2014 Mar 25;27:196-212.

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	Implant infection model in rats and rabbits
2	Spinal fusion model in rats and rabbits in combination with ectopic implants
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Implant infection model in rats and rabbits</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Implant infection model in rats and rabbits
Volgnummer	Type dierproef				
1	Implant infection model in rats and rabbits				

*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.

We would like to use a rat and rabbit model of an implant-related infection [1]. In this model, a metal implant is inserted in the tibiae of the animals while it is in the meantime inoculated with a specific dose of bacteria [2]. We will use *S. aureus* to induce a chronic infection, as this is a clinically relevant strain which is often associated with biofilm formation [3]. As we are using *S. aureus* ATCC 6538 for our in vitro studies, we will likely also use this strain for the animal studies. A pilot study will be performed in the rat model to determine the minimal dose of *S. aureus* needed to induce a chronic infection. For the rabbit model, such a pilot has already been performed within our group. As such, a dose of  $10^5$  CFU will be used. After several weeks (4 weeks normally, and 8 weeks when long-term effects are studied) [1], the number of bacteria can be quantified as a measure of bacterial killing (bacterial culture and

histology). Furthermore, bone formation around the implant is quantified to determine the bone-implant integration (micro-CT imaging and histology) [2].

The bacterial-killing activity and bone-stimulating activity of our implant coatings will be compared to untreated control implant. In our experiments, we would like to test titanium nanotubes [4], inorganic nanoparticles (e.g. zinc and silver) [5, 6], and layer-by-layer coatings [7] for their bacterial-killing and bone-stimulating activity. Growth factors such as the bone morphogenetic proteins can be used together with the inorganic nanoparticles to promote bone formation in the layer-by-layer coatings.

We will perform initial studies in rats, which have shown to be a very suitable animal model for this purpose due to their size allowing implant placement, easy handling, and the establishment of chronic infection with clinically-relevant bacterial strains [1]. When successful coatings are identified, we would also like to test their efficacy in the rabbit model. The rabbit model, due to their more comparable immune system to humans, is superior to the rat model in a translational aspect [8,9]. Lower doses of bacteria can generally be used in rabbits than in rats, which are more comparable to the clinical situation [1]. For the same reason, in addition to bacterial-killing and bone-implant integration, the rabbit model is a superior model to study local and systemic markers of inflammation. Finally, larger-size implants can be tested which allow for more surface modification.

The different experiments can be summarised as follows:

- test coatings with inorganic nanoparticles (e.g. zinc and silver) in rats. The different elements will be incorporated into titanium nanotube coatings. To embed silver nanoparticles in titanium oxide nanotubes, two different concentrations (0.5 and 1.5 M) of AgNO<sub>3</sub> will be used [5]. Also two different concentrations (0.015 and 0.030M) of Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> will be used [6]. We are currently testing the in vitro bacterial-killing activity of these elements. The animals will be euthanized after 4 weeks.
- test the controlled release of the aforementioned nanoparticles in rats. For this purpose, a thin layer of thermo-sensitive hydrogel will be used in combination with the nanotubes. As we are also interested in the more long-lasting effects of these coatings, animals will be euthanized at two different time points (4 and 8 weeks).
- test a layer-by-layer designed coating with dual purpose, e.g. bacterial-killing and stimulating bone-implant integration in rats. These layers consist of antimicrobials (e.g. antibiotics like gentamicin)[10] and growth factors (e.g. bone morphogenetic proteins)[11]. Here, also two different concentration from each agent will be studied in the same rat model. These components will be tested alone, or in combination, to determine the coating with best bacterial-killing and bone-stimulating activity. We are currently still developing the technology to produce the layer-by-layer coatings. If this is successful, in vitro release profile of layer-by-layer components will be determined. Depending on the release profile that can be obtained in vitro, the animals will be euthanized after either 4 or 8 weeks.
- test the most promising conditions in the rabbit model. The rabbit model is a more clinically relevant model because lower doses of *S. aureus* can be used [1]. Furthermore, larger-size implants can be tested which allow for more surface modification. The same analyses will be performed as in the rats. In addition however, blood samples are harvested to measure systemic markers of inflammation. Local signs of inflammation are quantified by histology and cytokine measurements on tissues harvested locally. In this study, the rabbits are euthanized at 4 and 8 weeks to also test the long-lasting effects of the coatings.

## REFERENCES

- [1] Reizner, JG Hunter, NT O'Malley, RD Southgate, EM Schwarz, SL Kates. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur Cell Mater.* 2014 Mar 25;27:196-212.
- [2] Moojen DJ, Vogely HC, Fleer A, Nikkels PG, Higham PA, Verbout AJ, Castelein RM, Dhert WJ. Prophylaxis of infection and effects on osseointegration using a tobramycin-periapatite coating on titanium implants--an experimental study in the rabbit. *J Orthop Res.* 2009 Jun;27(6):710-6.
- [3] Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, Giannini S, Arciola CR. Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* 2011 Nov;6(11):1329-49
- [4] Gao A, Hang R, Huang X, Zhao L, Zhang X, Wang L, et al. The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts. *Biomaterials* 2014;35:4223-35.
- [5] Zhao L, Wang H, Huo K, Cui L, Zhang W, Ni H, et al. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011;32:5706-16.
- [6] Liu W, Su P, Chen S, Wang N, Ma Y, Liu Y, et al. Synthesis of TiO<sub>2</sub> nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. *Nanoscale* 2014;6:9050-62.
- [7] Necula BS, Fratila-Apachitei LE, Zaat SAJ, Apachitei I, Duszczuk J. In vitro antibacterial activity of porous TiO<sub>2</sub>-Ag composite layers against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomaterialia* 2009;5:3573-80
- [8] Bosze, Z. and Houdebine, L.M. (2006) Application of rabbits in biomedical research: a review. *World Rabbit Sci.* 14:1-14.
- [9] Dharmadhikari, A. and Nardell, E.A. (2008) What animal models teach humans about tuberculosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39:503-508.
- [10] Cosgrove SE, Vigliani GA, Fowler VG Jr, Abrutyn E, Corey GR, Levine DP, Rupp ME, Chambers HF, Karchmer AW, Boucher HW. Initial low-dose gentamicin for *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis is nephrotoxic. *Clin Infect Dis.* 2009 Mar 15;48(6):713-21
- [11] Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop.* 2007 Dec; 31(6): 721-727.

---

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.

Rats:

Surgical procedure- the left hind leg is shaven and disinfected with povidone iodine. An incision is made to the anteromedial aspect of the tibia. To access the medullary cavity, a hole between the tibial plateau and the tibial tuberosity is drilled with a smooth stainless steel pin (K-wire) through the cancellous bone of the proximal metaphysis. The K-wire is inserted into the medullary cavity and pushed forward distally to create space in the cavity. After removal, a small volume of either saline or bacteria are injected into the medullary cavity by a microsyringe. After bacterial inoculation, the differently coated K-wires are inserted and the skin and fascia are sutured with resorbable sutures. The surgeries are estimated to take half an hour. In vivo scanning is performed with appropriate anesthetics (max. 3 times depending on the duration of the experiment). Fluorochrome markers are injected subcutaneously (max. three time points depending on the duration of the experiment) to determine the onset and development of bone formation. The animals are euthanized after 4 or 8 weeks depending on the coating which is tested.

Anesthetics- start and maintained with isoflurane/oxygen

Pain management-injection analgetics (usually buprenorphine with 12 hour interval), starting before surgery and continued after surgery. The protocol will be developed in consultation with the designated veterinarian. If there is any indication that the rats continue to suffer pain, the pain medication will be prolonged.

Antiseptic techniques- Surgery will be performed under aseptic conditions. The skin will be disinfected with povidone iodine. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves, and a surgery mask/cap. Only autoclaved instruments will be used.

Postoperative care- The animals will be placed on heat blankets. The animals will be housed per two if possible. The animals will be scored daily for well-being in the first week, and weekly thereafter. The rats will receive special food if they have reduced food intake due to the surgery and the pain medication.

Infection measurements- In vivo scanning under isoflurane anesthetics is performed for a maximum of 3 times in total. Bacterial culture of bone and implant after euthanization is the primary outcome measure for bacterial killing. Local inflammation markers will be measured on tissue samples.

Bone formation measurements- Bone-implant contact as determined on histology and aforementioned in vivo scans. The incorporation of fluorochromes is assessed by fluorescence microscope. This will elucidate the onset and progression of bone formation around the implant.

Euthanasia protocol- One of the methods listed in appendix IV of directive 2010/63/EU. The rats will be euthanized at 4 or 8 weeks after start of the experiment with an overdose of CO2 inhalation.

Rabbits:

Surgical procedure- The left hind leg is shaven and disinfected with povidone iodine. The stifle joint is opened with an incision through the skin and the patellar tendon. A hole is drilled into the tibia through the cartilage layer with a hand drill. The bacteria are inoculated into the cavity in a small volume with a pipette. A coated titanium implant is press-fit into the cavity, flushed with the cartilage surface. The patellar tendon and the skin are closed with resorbable sutures. The surgeries are estimated to take half an hour. In vivo micro-CT scanning is performed with appropriate anesthetics similar to the surgery (up to 3 times). Fluorochrome markers are injected subcutaneously to determine the onset and progression of bone formation (max. at 3 different time points). Blood is drawn from the ear vein (at max. 5 time points) to measure systemic markers of inflammation. The animals are euthanized after 4 and 8 weeks.

Anesthesia- Combination of injection analgetics/anesthetics (in consultation with the designated veterinarian).

Pain management- Injection analgetics (usually buprenorphine with 12 hour interval), starting before surgery and continued after surgery (in consultation with the designated veterinarian). If any signs of pain continue, pain medication will be prolonged.

Antiseptic techniques- Surgery will be performed under aseptic conditions. The skin will be disinfected with povidone iodine. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves, sterile gown, and a surgery mask/cap. Only autoclaved instruments will be used.

Postoperative care- The animals will be placed on heat blankets. The animals will be housed per two if possible. The animals will be scored daily for well-being in the first week and weekly thereafter. The rabbits will receive special food (soaked in water) when food intake is decreased (e.g. by systemic inflammation and as a side effect of the pain medication).

Infection measurements- In vivo scanning (under injection analgetics/anesthetics) is performed for a maximum of 3 times in total. Bacterial culture of bone and implant after euthanization is the primary outcome measure for bacterial killing. Systemic markers of inflammation are measured on blood samples.

Bone formation measurements- Bone-implant contact as determined on histology and aforementioned in vivo scans. The incorporation of fluorochrome marks will be determine by fluorescence microscopy to assess the onset and progression of new bone formation.

Euthanasia protocol- One of the methods listed in appendix IV of directive 2010/63/EU.

The rabbits will be euthanized after 4 and 8 weeks after the start of the experiment (usually with an overdose of Pentobarbital i.v.). This will be done under general anesthetics and pain medication, similar to the protocol used during surgery.

---

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

The following section describes the minimal number of animals needed for each study. For each study, a percentage of animals are added to the total to account for a possible loss of animals during the experiment. The percentage loss of animals is based on literature (rat experiments) or on our own experience with the same model and inoculation dose (rabbit experiments). Based on literature, a higher percentage loss is expected in rats (10%) compared to rabbits (5%). Furthermore, we expect a higher percentage loss in the pilot study performed in rats, due to a higher chance of hematogenous infection. A pilot study has already been performed for the rabbit model by our group in the past.

STUDY 1, pilot study in rats (24 rats)

A pilot study will be performed to determine the minimal dose of *S. aureus* needed to get a chronic infection of the implant [1]. Although these doses are also described in literature [1], different experimental setting (bacterial culture conditions, materials, housing conditions) may affect the results. Our goal is not to demonstrate statistical significance differences. We believe the chosen group sizes will allow for the identification of the optimal bacterial dose. The minimal dose for which all three rats show the presence of bacteria in the bone after 4 weeks will subsequently be used to test the efficacy of the coatings.

Due to the relative higher chance of hematogenous infection for the higher CFU doses in this pilot study, a 20% of rats (4 rats) are added to the total to account for possible loss of animals.

- 1) Neg control (N=2)
- 2)  $10^2$  CFU *S. aureus* (N=3)
- 3)  $10^3$  CFU *S. aureus* (N=3)
- 4)  $10^4$  CFU *S. aureus* (N=3)
- 5)  $10^5$  CFU *S. aureus* (N=3)
- 6)  $10^6$  CFU *S. aureus* (N=3)
- 7)  $10^7$  CFU *S. aureus* (N=3)



For the following experiments, we will make an estimation of the the expected difference of the means and coefficient of variance will be based on the in vitro observations: 50% expected difference of the means and 50% coefficient of variance in bacterial killing. We will perform a one way ANOVA's with a Bonferroni post hoc correction. The alpha will be adjusted for the multiple comparisons of the experimental groups (specified next per individual experiment). A two sided test will be used. We will use the S. aureus dose as determined in the pilot study.

STUDY 2, the effect of inorganic nanoparticles (73 rats):

- 1) Untreated implant (N=11)
- 2) Implant with nanotubes (NT) (N=11)
- 3) Implant with NT + Silver (AgNO<sub>3</sub>, 0.5 M) (N=11)
- 4) Implant with NT + Silver (AgNO<sub>3</sub>, 1.5 M) (N=11)
- 5) Implant with NT + Zinc (Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.015 M) (N= 11)
- 6) Implant with NT + Zinc (Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.030 M) (N= 11)

The best performing concentration of each element (3/4 and 5/6) is compared to the NT control (group 2).

Using an adjusted 'alpha' of 0.025 (0.05/2), a power of 80%, and a two-sided test, we find that 11 animals are needed per group when considering the difference of the means and a coefficient of variance of both 50%. We add an extra 7 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. We believe that a loss of approximately 10%, due to systemic effects of infection, is a realistic estimation [2,3,4].

STUDY 3, the effect of controlled release of the inorganic nanoparticles (e.g. silver and zinc) (97 rats):

- 1) Implant with nanotubes (NT) (N=11 x 4 and 8 weeks)
- 2) Implant with NT + hydrogel (N=11 x 4 and 8 weeks)
- 3) Implant with NT + zinc in hydrogel (N=11 x 4 and 8 weeks)
- 4) Implant with NT + silver in hydrogel (N=11 x 4 and 8 weeks)

Groups 3 and 4 are compared to group 2 at the two different time points (no repeated measurements).

Using an adjusted 'alpha' of 0.025 (0.05/2), a power of 80%, and a two-sided test, we find that 11 animals are needed per group when considering the difference of the means and a coefficient of variance of both 50%. We add an extra 9 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. We believe that a loss of approximately 10%, due to systemic effects of infection, is a realistic estimation [2,3,4].

STUDY 4, the effect of layer-by-layer release of antimicrobials (e.g. gentamicin) and growth factors (e.g. BMP-2) (100 rats).

- 1) Untreated implant (N=13)
- 2) Implant + growth factor (e.g. BMP-2) low concentration (N=13)
- 3) Implant + growth factor (e.g. BMP-2) high concentration (N=13)
- 4) Implant + antimicrobial (e.g. gentamicin) low concentration (N=13)
- 5) Implant + antimicrobial (e.g. gentamicin) high concentration (N=13)
- 6) Implant + growth factor (e.g. BMP-2)/antibiotic (e.g. gentamicin) low concentration (N=13)

7) Implant + growth factor (e.g. BMP-2) /antibiotic (e.g. gentamicin) high concentration (N=13)

The best layer-by-layer designs will be compared to the effect of the individual components (group 6 vs. group 2 and 4; group 7 vs. group 3 and 5). Thus, 4 comparisons are made. Using an adjusted 'alpha' of 0.0125 (0.05/4), a power of 80%, and a two-sided test, we find that 13 animals are needed per group when considering the difference of the means and a coefficient of variance of both 50%. We add an extra 9 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. We believe that a loss of approximately 10%, due to systemic effects of infection, is a realistic estimation [2,3,4].

STUDY 5, the effect of the optimal bacterial-killing and bone promoting coatings (176 rabbits)

- 1) Untreated implant (N=12 x two time points)
- 2) Implant with nanotubes (N=12 x two time points)
- 3) Implant with Zinc or Silver (N=12 x two time points)
- 4) Implant with Zinc or Silver in hydrogel (N=12 x two time points)
- 5) Implant with growth factor (e.g. bone morphogenetic protein 2) (N=12 x two time points)
- 6) Implant with antimicrobial (e.g. gentamicin) (N=12 x two time points)
- 7) Implant with growth factor (e.g. bone morphogenetic protein 2)/antimicrobial (e.g. gentamicin) in layer-by-layer design (N=12 x two time points).

At each time point, group 4 is compared to group 3, and group 7 is compared to group 5 and 6 (no repeated measures). Thus, 3 comparisons are made. Using an adjusted 'alpha' of 0.0167 (0.05/3), a power of 80%, and a two-sided test, we find that 12 animals are needed per group when considering the difference of the means and a coefficient of variance of both 50%. We add an extra 8 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. Based on our previous experience with this model (DEC 2013.III.11.083), we believe that a loss of approximately 5% of the rabbits, due to the systemic effects of infection, is a realistic estimation.

In total, we will therefore need 294 rats and 176 rabbits.

## REFERENCES

- [1] Reizner, JG Hunter, NT O'Malley, RD Southgate, EM Schwarz, SL Kates. A systematic review of animal models for Staphylococcus aureus osteomyelitis. *Eur Cell Mater.* 2014 Mar 25;27:196-212.
- [2] Lucke et al. A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003 Oct 15;67(1):593-602.
- [3] Poepl et al. Daptomycin, Fosfomycin, or Both for Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Osteomyelitis in an Experimental Rat Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov; 55(11): 4999–5003.
- [4] Poepl et al. Efficacy of Fosfomycin Compared to Vancomycin in Treatment of Implant-Associated Chronic Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Osteomyelitis in Rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Sep; 58(9): 5111–5116.

---

## B. De dieren

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

---

#### Rats:

Male Sprague Dawley, age 12-16 weeks (Charles River) . We expect to use 279 rats (see Statistical Methods).

The rat is a good animal model for our screening studies due to their small size, low cost, and established models of developing osteomyelitis described in literature [1,2]. Sprague Dawley rats have been used most often. By selecting the Sprague Dawley rats, we can base our bacteria inoculation dose on the literature.

Male rats are preferred of their larger size, which allows for larger K-wires to be implanted into the tibia, offering a larger surface area of the coating. The age of the rats is subsequently selected to ensure enough space in the tibial cavity for the placement of the k-wires (0.8 Ø x 25). Furthermore, the estrogen levels in female rats can fluctuate due to stress and age [3], and can affect bone regeneration [3,4]. Furthermore, it has been shown that male and female rats show a difference in their bone metabolism [5, 6,7]. If male and female rats are studied in a mixed population, this will cause a strong increase in the observed variance. We therefore prefer to use male rats only. The male rats can be housed together without problems.

#### Rabbits:

Female New Zealand White, age 12-16 weeks (Charles River). We expect to use 176 rabbits (see Statistical Methods).

Our group has previously performed dose-response studies with *S. aureus* in this adolescent rabbit model. Female rabbits can be used, which allows for grouped housing. Although, based on literature, both male and female rabbits can be used for this kind of research, we would like to use a single sex of rabbits. First, this minimizes the variance in the experiments, allowing the use of less animals. Second, we can compare our data to the results we obtained previously with this model. The selected age of the rabbits allows for the implantation of more clinically relevant-size implants (4 mm Ø x 25 mm).

Furthermore, the adolescent age of the rabbits allows for in vivo scanning as this is problematic for larger animals, To our best knowledge, current literature does not suggest that adolescent rabbits may be more suitable as an osteomyelitis model than mature rabbits, or vice versa.

#### REFERENCES

1. W. Reizner, J.G. Hunter, N.T. O'Malley, R.D. Southgate, E.M. Schwarz, and S.L. Kates. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur Cell Mater.* 2014; 27: 196–212.
2. Patel M, Yuri Rojavin, Amir A. Jamali, Samantha J. Wasielewski, and Christopher J. Salgado. Animal Models for the Study of Osteomyelitis. *Semin Plast Surg.* 2009 May; 23(2): 148–154.
3. Hong L, Sultana H, Paulius K, Zhang G. Steroid regulation of proliferation and Biochem Mol Biol. 2009 Apr;114(3-5):180-5. PubMed PMID: 19429449. Pubmed Central PMCID: 2682591.
4. Calis M, Demirtas TT, Atilla P, Tatar I, Ersoy O, Irmak G, et al. Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue-engineering study. *Plastic and reconstructive surgery.* 2014 Apr;133(4):499e-510e. PubMed PMID: 24675202.
5. Sample SJ, Racette MA, Hao Z, Thomas CF, Behan M, Muir P. Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. *PloS one.* 2012;7(9):e43215. PubMed PMID: 22984413. Pubmed Central PMCID: 3439425.
6. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, Perka C, Duda GN, Kasper G. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone.* 2009 Dec;45(6):1065-72

---

### 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.

Replacement:

The effects of the implant coatings are first studied in vitro. For this purpose, we use a cytotoxicity assay. Also, bacterial proliferation and biofilm formation can be assessed in vitro. The best-performing conditions will subsequently be tested in vivo, as indirect effects by immune cells is hard to mimic in an in vitro model.

Reduction:

For each experiment, a power analysis will be performed to determine the minimum number of animals required. The inter-animal variation will be minimized so that smaller group sizes are needed to reach statistical significance. Rats with the same sex and age will be used.

By performing in vivo scanning in the animals, the effects of the infection on bone changes can be assessed at different time points without the need of different animals for different time points (not possible if bacterial culture has to be performed at different time points).

Refinement:

- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment
- Animals have cage enrichment
- Animals are weighed weekly to monitor welfare
- Animals receive appropriate analgetics and anaesthetics (in consultation with the designated veterinarian)
- The animals are housed together as long as no signs of aggression towards each other exist
- Daily scoring of the animals will be performed after the surgeries. Pain medication will be continued if necessary. For rabbits, this is a standard procedure.

For rats, the extra handling needed for scoring will be requested in the working protocol

- In vivo scanning will be performed under adequate anaesthetics (in consultation with the designated veterinarian)

- During and after surgery, the animals will be placed on heat blankets
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes of the animals during surgery
- Skin wounds will be sutured intracutaneously to prevent opening

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.

The animals will have at least 1 week to acclimatize to the new environment in the GDL. The animals will be housed per two as much as possible. The respiration of the rats will be monitored by the researcher during surgery. The rabbits will be monitored for respiratory and heart function by the designated biotechnician. The animals will be placed on heat blankets after surgery and returned to routine housing after recovery of anesthesia. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed after surgery. Food is given ad libitum. The animals will be scored weekly by the animal caretakers or the researcher (in consultation with each other). After surgeries, this frequency will be increased. In the case of unexpected complications, the animal caretakers and the designated veterinarian are consulted.

## 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.

These coating methods have been newly developed by our group. With the current literature, we are unable to predict the performance of our coating methods in an in vivo model.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Moderate stress (cumulative) is estimated based on the following procedures:

- Moderate stress due to the surgery. Animals will experience pain in the treated joint. The animals might avoid loading of the limb after surgery. Bacterial infection causes local and systemic signs of inflammation. Animals will have reduced food intake and experience weight loss after surgery. In previous experiments, the animals were loading the affected limb a few days after surgery.
- Analgetics: mild stress. Animals experience lameness and reduced food intake due to the injection analgetics.
- Scoring of the animals after surgery: mild stress. Extra handling of the animals for weighing and scoring
- In vivo scanning (max. 3 times depending on the duration of the experiment): mild to moderate stress. Due to handling and anesthetics.
- Euthanasia: mild stress due to handling
- Blood harvesting (rabbits, max. 5 times depending on the duration of the experiment): moderate stress due to local ear irritation and stress during handling (procedure is mild, but is considered as moderate because it is repeated)
- Fluorochrome injections (max. 3 times depending on the duration of the experiment): moderate stress due to local skin irritation and stress during handling (procedure is mild, but is considered as moderate because it is repeated)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

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

1. At least 1 week to acclimatize to the new environment
2. Adequate use of analgetics (in consultation with the designated veterinarian)
3. Adequate use of anesthetics (in consultation with the designated veterinarian)
4. Observation of vital signs during surgery.

rats: depth of narcosis, respiration, tail pinch test

rabbits: monitoring of respiratory and heart function by the biotechnical. The depth of narcosis (twitching/movement) can additionally be observed by the researcher performing the surgery.

5. Scoring of the animals daily after surgery  
6. Euthanasia according to one of the methods listed in Appendix IV of directive 2010/63/EU.  
7. Pain medication, starting before surgery, and continued for two days standard. If there is any indication, pain medication will be continued beyond this period.

#### 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.

- The rats will be euthanized in case one or more of the following humane endpoints are observed:
  - Weight loss (criteria determined in consultation with the veterinarian)
  - Severe lethargy
  - Severe tachycardia
  - Severe tremor
- Possible other signs of sepsis
- Loss of the animals' ability to walk and feed themselves
- Unexpected wound complications (such as non-closing and severe pus formation)
  
- The rabbits will be euthanized in case one or more of the following humane endpoints are observed:
  - Weight loss (criteria determined in consultation with the designated veterinarian)
  - Severe lethargy
  - Severe tachycardia
  - Severe tremor
  - Possible other signs of sepsis
  - Loss of the animals' ability fo walk and feed themselves
  - Joint infection with severe pus formation.

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

Rats: unlikely, max. 10%. The chance is higher in the pilot study, max. 20%.

Rabbits: very unlikely, max. 5%.

#### K. Classificatie van ongerief

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

The procedure is classified as moderate.

## 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.

The animals need to be euthanized to harvest the bone and implant for bacterial culture.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Spinal fusion in rats and rabbits in combination with ectopic implants</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	2	Spinal fusion in rats and rabbits in combination with ectopic implants
Volgnummer	Type dierproef				
2	Spinal fusion in rats and rabbits in combination with ectopic implants				

*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.

We have previously identified inflammation-associated cytokines and bacterial-derived factors that could serve as bone-stimulating coatings on ceramics or metals intended for various orthopedic applications [1,2,3]. We more recently also showed that the use of components derived from bacteria is potentially a safe and effective way to stimulate bone formation (unpublished). These biological factors enhance bone formation by causing a beneficial immune response.

Currently, the transplantation of patient's own bone is used to stimulate bone formation in patient's when needed, including non-healing fractures, filling of large bone defects, or the re-alignment of the skeleton [4]. There are however a lot of complications associated with the bone harvesting procedure and there

is only a limited amount of bone available for the surgeon. The coating of materials with the aforementioned biological factors could be an alternative way to stimulate de novo bone formation or to improve the bone integration of implants. The fusion of vertebrae- e.g. during abnormal curvature of the spine or due to chronic back pain- is the most important application for which bone grafts are needed [6].

We aim to test the efficacy of our coatings on the bone formation in a spinal fusion model in rats and rabbits [7, 8]. As spinal fusion is the most important application for which bone grafts are used, we would like to test the efficacy of our coatings in the same setting. A calcium phosphate ceramic will be used (e.g. biphasic calcium phosphate BCP or tricalcium phosphate TCP). These materials are promising for use in spinal fusion because of their ability to conduct bone formation along their surface. If bone-stimulating coatings are identified in the spinal fusion model, these can directly be tested for their ability to improve bone integration in the implant infection models.

The spinal fusion procedure is relatively simple to perform in these animals, in contrast to the spinal fusion technique in humans or larger animal models, where instrumentation is required. The rat spinal fusion model allows for better study of the underlying processes as there are more research tools available for rodents compared to rabbits and larger animals. The rabbit model on the other hand allows for better translation to the clinic, as larger constructs can be tested and the immune system is more comparable to humans. When using inflammation-associated cytokines or components derived from bacteria, the immune response is an important outcome parameter. We believe that this is more representative of the human situation in rabbits than it is in rats. Furthermore, in rabbits, a comparison can be made between our coating method and the current gold standard in the clinic (e.g. autologous bone harvested from the hip bone). This is difficult to perform in rats due to their smaller size.

The implantation of ectopic constructs in the same animals allows for additional studies to be performed in parallel to the functional spinal fusion test in the orthotopic location.

First, in an ectopic location, bone formation is only the result of osteoinduction (i.e. differentiation of stem cells into bone cells), whereas osteoconduction (i.e. bone outgrowth from existing bone) also plays a role in the orthotopic location. By combining the ectopic and orthotopic sites, the potential of the inflammatory compounds for osteoinduction and osteoconduction can be both studied. This can elucidate the potential use of the compounds in different applications and locations.

Second, the optimal dose of in vitro-identified inflammatory compounds can be studied in an ectopic location before testing them in an orthotopic location. Because there are more implantations possible in the ectopic site compared to the orthotopic site, we can also try to identify new bone-stimulating inflammatory compounds in the ectopic location which can be tested in follow-up studies. For the first in vivo studies, the optimal dose of interesting inflammatory compounds have already been determined ectopically in a previous study and can be directly tested in an orthotopic location. By combining the ectopic and orthotopic locations, the animals are used in an optimal way and multiple research questions can be answered within the same study.

Several outcome parameters will be studied related to new bone formation and inflammation. In vivo micro-CT scans are performed under general anesthesia to quantify new bone formation at different time points. Fluorochrome markers are injected at different time points to trace the onset and progression of bone formation. After euthanization of the animals, local inflammation markers are measured on tissue samples. For the ectopic implants, quantification of the bone staining in histological samples is performed. For the spinal fusion implants, a combination of different methods is used to assess the degree of fusion between the vertebrae, including manual palpation, ex vivo micro-CT imaging, and quantification of the bone tissue in histological samples. In the rabbit studies, the systemic effects of the coatings will also be assessed by measuring systemic markers of inflammation on blood samples. Local inflammation markers are also measured on the spinal fusion masses.

## References:

1. M Croes, F. Cumhur Oner, Moyo C. Kruyt, Taco J. Blokhuis, Okan Bastian, Wouter J.A. Dhert, Jacqueline Alblas. Proinflammatory Mediators Enhance the Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells after Lineage Commitment. Plos one 2015.
2. M Croes, W Boot, B Pouran, MC Kruyt, D Gawlitta, Y van der Helm, C Vogely, H Weinans, J Alblas, WJA Dhert, FC Oner. Bacterial infection increases bone volume in a rabbit osteomyelitis model. 2015. Submitted
3. M Croes, W Boot, MC Kruyt, WJA Dhert, B Pouran, FC Oner, J Alblas. Bacteria-associated inflammation induces bone formation in a pre-clinical rabbit model. In preparation
4. PV Giannoudis, H Dinopoulos, E Tsiridis : Bone substitutes: An update. Injury 2005.
5. BM Desai. Osteobiologics. Am J Orthop 2007
6. WG De Long, TA Einhorn, K Koval et al. Current concepts review: Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. J Bone Joint Surg AM 2007
7. SD Boden, GJ Martin, M Morone, JL Ugbo, L Titus, WC Hutton. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. Spine. 1999;24:320–327
8. Drespe et al. Animal models for spinal fusion. Spine J. 2005.

---

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.

## Surgical procedures

Ectopic implantations: Using a single skin midline incision in the dorsum, PMMA (poly methyl methacrylate) discs are implanted intramuscularly and subcutaneously. We have previously used up to 18 samples in rabbits and up to 14 samples in rats, leaving enough space between the samples to minimize cross-over effects between samples. After 6 weeks, all PMMA discs are removed from their surrounding membranes ('biomembranes'), and replaced scaffolds (calcium phosphate ceramics or porous metal implant) coated with the factors of interest. These 'biomembranes' act as a physical barrier, preventing initial leakage of growth factors or inflammation-associated factors to the surrounding tissues [1]. As a result, one creates a more localized inflammatory response and limits the cross-over effects to neighbouring implants. The first procedure (implantation of the spacer) is expected to take approximately 1 hour, while the second procedure (implantation of the loaded material in the 'biomembrane') is thought to take approximately 1.5 hours. The implantation of the loaded constructs is always performed in a randomized way.

The membranes act as a physical barrier, preventing initial leakage of the delivered components which could affect neighbouring scaffolds. The skin wounds are closed with resorbable sutures. During the experiment, fluorochrome markers are injected subcutaneously at max. three time points to determine the progression of bone formation by fluorescence microscopy. In vivo micro-CT scans are performed under general anesthesia to quantify the progress of bone formation (max. 3 times). The animals are euthanized 8-12 weeks after the second surgery to retrieve the implants for analyses by histology. This exact end point (8-12 weeks) is chosen for each experiment separately, but is determined by the speed of bone formation which is expected (i.e. if bone stimulating growth factors such as BMPs are used), and will be minimized.

This model has been used by our group in both species successfully without loss of animals. In rabbits, blood is harvested from the ear vein at max. 5 time points to measure systemic markers of inflammation.

Spinal fusion: this procedure is combined with the second surgery for the ectopic implantations at week 6. The dorsal midline skin incision is followed by two paramedian fascial incisions between the multifidus and longissimus muscles until the transverse processes in the lumbar region are exposed. The exposed transverse processes are decorticated bilaterally with an electric burr. On both sides of the vertebra, the graft of interest is implanted next to the spine. This involves a calcium phosphate ceramic or a porous metal implant in the experimental group, with or without coating with the biological factor of interest. When a comparison is made with the current gold standard in the clinic (i.e. autologous bone), separate fascial incisions are used to harvest corticocancellous bone from the iliac crest bone to place between the transverse processes in the same way. The spinal fusion procedure can be performed at a single level or at two levels of the vertebrae [1,2, 3]. The skin wound is closed with resorbable sutures. The animals are euthanized (see ectopic implantations) for ex vivo micro-CT scanning and the fusion masses/ectopic implants are retrieved for histological analyses. Local inflammation markers are measured in the fusion masses.

#### Bone regeneration measurements

The primary outcome parameter is the amount of bone formation after 8-12 weeks. For the ectopic implants, quantification of the bone in histological samples is the best method. For the spinal implants, a combination of techniques is used to assess the degree of fusion between the vertebrae, including manual palpation, in vivo and ex vivo micro-CT, and quantification of the bone tissue in histological samples. Animals will receive fluorochrome markers subcutaneously to determine the onset and localization of new bone formation by fluorescence microscopy post-mortem.

#### Inflammation measurements

In the rabbits, blood will be harvested at max. 5 time points to measure systemic markers of inflammation. Local inflammation markers will be measured on tissue samples after euthanization.

#### Animal stress

The animals are estimated to experience mild stress (cumulative). The procedures are expected to take approximately 1 hour (first surgery) and 2 hours (second surgery).

#### Anaesthesia protocol

Rats: Start and maintained with isoflurane/oxygen.

Rabbits: a combination of injection analgetics/anesthetics is used. The protocols for adequate anaesthesia are developed together with the veterinarian.

#### Pain management

All animal receive injection analgetics. The protocols used for pain management will be developed together with the designated veterinarian. If any

unexpected signs on pain continue to exist in the first days after the operational procedure, as observed during daily scoring of the animals, the designated veterinarian will be consulted for the adequate pain management.

#### Antiseptic techniques

All operations will be performed aseptically conditions. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves and sterile gown. The surgeon will wear a surgery mask and cap. Only autoclaved instruments will be used. After shaving, the skin will be disinfected with Providone Iodine. All materials introduced into the animals are autoclaved or filtered to ensure sterility.

#### Postoperative care

The animals will be placed on heat blankets post-operatively. The animals will be housed per two, unless there are signs of aggression towards each other. The animals will be scored daily for one week after the operational procedure. The weight of the animals will be measured once a week. The animals will receive injection pain medication for two days at minimum, and longer if necessary.

#### Euthanasia protocols

Euthanasia is performed according to one of the methods listed in appendix IV of directive 2010/63/EU. The animals will be euthanized 8-12 weeks after the second surgery . This involves CO2 inhalation in rats, and an overdose of Pentobarbital i.v. in rabbits under the same general anaesthesia and pain medication as the surgery procedure.

#### References:

1. Viateau V, Guillemin G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res* 2007;25: 741-9
2. SD Boden, GJ Martin, M Morone, JL Ugbo, L Titus, WC Hutton. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine*. 1999;24:320–327
3. AM Riordan, R Rangarajan, JW Balts, WK Hsu, PA Anderson. Reliability of the Rabbit Postero-Lateral Spinal Fusion Model: A Meta-Analysis. *JOR* 2013
4. Drespe et al. Animal models for spinal fusion. *Spine J*. 2005.

---

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

The following section describes the minimal number of animals needed for each study. For the rabbit study, a 5% loss of animals is estimated. This percentage is based on literature. As this loss in the rabbits is mainly the result of the autologous bone harvesting procedure, it is not expected in the rat studies.

The outcome parameter on which the group size are based is the success of spinal fusion (yes or no) as determined by micro-CT. The difference of the means and the coefficient of variance of treatment with a biological coating in the spinal fusion model is unknown [1]. We can therefore only determine the minimal

group size based on a rough estimation of these parameters.

In a typical experimental design, 3 groups are used. We will perform a one way ANOVA's with a Bonferroni post-hoc correction. The alpha is adjusted according to two comparisons that are made (experimental group vs. positive control and negative control OR two experimental groups vs. positive control). For example:

- 1) Positive control group, autograft or bone morphogenetic protein (BMP)
- 2) Negative control group (e.g. calcium phosphate ceramic such as biphasic calcium phosphate BCP or tricalcium phosphate TCP)
- 3) Experimental group (e.g. calcium phosphate ceramic coated with proinflammatory cytokine or bacterial-derived factor)

Using an adjusted 'alpha' of 0.025 (0.05/2), a power of 80%, and a two-sided test, we find that 11 animals are needed per group when considering the difference of the means and a coefficient of variance of both 20%. We hereby consider a difference of the means of at least 20% to be of clinically relevance.

We expect to perform the following studies in the upcoming 5 years:

STUDY 1, the effect of inflammation-associated cytokines on bone formation in rats (33 rats):

- Group 1. Pos control, calcium phosphate with BMP, N=11
- Group 2. Neg control, empty calcium phosphate (e.g. BCP or TCP), N=11
- Group 3. Experimental group, calcium phosphate coated with proinflammatory cytokines, N=11

We have already determined the optimal concentration of a number inflammatory compounds in an ectopic location. These can be studied in the orthotopic location in study 1. Simultaneously, we can perform dose studies for bacterial components determined in vitro in the ectopic location in the same animals. These can then be tested in the orthotopic location in study 2.

STUDY 2, the effect of bacterial components on bone formation in rats (33 rats):

- Group 1. pos. control, calcium phosphate with BMP, N=11
- Group 2. Experimental group 1, calcium phosphate coated with bacterial component 1, N=11
- Group 3. Experimental group 2, calcium phosphate coated with bacterial component 2, N=11

The optimal concentration of bacterial components are determine in the ectopic location in study 1. These can be studied in the orthotopic location in study 2. Simultaneously, we can perform dose studies for future experiments in the ectopic location in study 2.

STUDY 3, the effect of inflammation-associated cytokines on bone formation and systemic inflammation markers in rabbits (35 rabbits):

- Group 1. Pos control, autologous bone, N=11
- Group 2. Neg control, empty calcium phosphate, N=11
- Group 3. Experimental group, calcium phosphate coated with inflammation-associated cytokines, N=11

For this rabbit study, we add an extra 2 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. We believe that a loss of approximately 5%,

due to deep wound infections or autologous bone harvest-associated nerve damage and blood loss, is a realistic estimation [2-6].

We have already determined the optimal concentration of a number inflammatory compounds in an ectopic location. These can be studied in the orthotopic location in study 3. Simultaneously, we can perform dose studies for bacterial components determined in vitro in the ectopic location in the same animals. Subsequently, the optimal dose can be tested in the orthotopic location in study 4.

STUDY 4, the effect of bacterial components on bone formation and systemic inflammation markers in rabbits (35 rabbits) :

Group 1. Pos control, autologous bone, N=11

Group 2. Experimental group 1, calcium phosphate coated with bacterial component 1, N=11

Group 3. Experimental group 2, calcium phosphate coated with bacterial component 2, N=11

For this rabbit study, we add an extra 2 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. We believe that a loss of approximately 5%, due to deep wound infections or autologous bone harvest-associated nerve damage and blood loss, is a realistic estimation [2-6].

The optimal concentration of bacterial components are determine in the ectopic location in study 3. These can be studied in the orthotopic location in study 4. Simultaneously, we can perform dose studies for future experiments in the ectopic location in study 4.

Thus, we estimate that in total 66 rats and 70 rabbits are needed.

## REFERENCES

1. AM Riordan, R Rangarajan, JW Balts, WK Hsu, PA Anderson. Reliability of the Rabbit Postero-Lateral Spinal Fusion Model: A Meta-Analysis. JOR 2013
2. Bransford et al. Effect of zoledronic acid in an L6-L7 rabbit spine fusion model. Eur Spine J. 2007 Apr; 16(4): 557-562.
3. Cinotti et al. Experimental posterolateral spinal fusion with porous ceramics and mesenchymal stem cells. J Bone Joint Surg Br. 2004 Jan;86(1):135-42.
4. Lee et al. The effect of acute smoking on spinal fusion: an experimental study among rabbits. J Trauma. 2005 Aug;59(2):402-8.
5. Lehman et al. The effect of alendronate sodium on spinal fusion: a rabbit model. Spine J. 2004 Jan-Feb;4(1):36-43
6. Long et al. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on spinal fusion. J Bone Joint Surg Am. 2002 Oct;84-A(10):1763-8.

---

## B. De dieren

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

We would like to use both rats and rabbits for our experiments. There are more research tools (e.g. antibodies) available for the rat species, allowing for more mechanistic studies. The rabbits on the other hand allow for more translational research: safety studies can be performed due to their comparable immune system to humans, a comparison can be made between our coating and the golden standard (i.e. autologous bone grafting) and larger constructs can be tested in rabbits

Rats: male Fischer 344, 10-16 weeks (Charles River). We estimate to use 70 rats (see Statistical Methods).

The Fischer 344 rat has been used as a spinal fusion model before [1]. Our ectopic rat model also makes use of this male rat strain, which allows for comparison of the data when using calcium phosphates or BMP-2. Furthermore, in this model we can make a good prediction of the amount of bone formation in the control group, which allows us to select the appropriate timepoints for analyses. The estrogen levels in female rats can fluctuate due to stress and age [2], and can affect bone regeneration [3,4]. Furthermore, it has been shown that male and female rats show a difference in their bone metabolism [5,6]. If male and female rats are studied in a mixed population, this will cause a strong increase in the observed variance. We therefore prefer to use male rats only. As an advantage, we have experienced that the male Fischer 344 rats can be housed together without problems [5,6]

Rabbits: adult female New Zealand White, 20-24 weeks (Charles River). We estimate to use 70 rabbits (see Statistical Methods).

The rabbit spinal fusion model has been used frequently, as the fusion rate with autologous bone is similar to humans. A number of characteristics of the rabbits (age, weight, gender, species) have been tested on the rate of fusion in a meta-analysis study [7]. This study shows that the use of female New Zealand white rabbits is very suitable. For our research this is beneficial, as we previously studied the biological coating components in female New Zealand white rabbits too. However, we wish to keep the sex within our spinal fusion model fixed, due to the 20% difference in the fusion rate between male and female rabbits [7]. The increase in variance when using a mixed-gender population would result in a need for a larger sample size to demonstrate a statistically significant difference. Individual housing of male rabbits is associated with a decreased general well-being, therefore the use of females may be preferable. There is no evidence that fluctuating estrogen levels in female rabbits can affect the bone formation process [8]. In addition, the rabbit tibia model also makes use of female rabbits, therefore allowing better translation to the spinal fusion model. This meta-analysis furthermore shows that the animals should be at least 3 kg in weight, while there seems to be less of an effect for the age of the animals. Our choice of the age/weight allows for a sufficient number of ectopic implants in the dorsal region, with enough space between them to minimal cross-over effects between the samples.

Adult rabbits are used as this seems to be beneficial for the success of fusion. Furthermore, almost all studies described in literature make use of adult rabbits [7].

Generally speaking, the rabbit model is used in a final step before an instrumented spinal fusion model (e.g. sheep or goats). As such, larger constructs can be used and the rabbit immune system allows for prediction of dose effects considering that its immune system is more comparable to humans than rodents [9, 10]. This is an important aspect to consider, as some of the biological coatings induce bone formation through an immune response.

#### References:

1. Lopez et al. Acceleration of Spinal Fusion Using Syngeneic and Allogeneic Adult Adipose Derived Stem Cells in a Rat Model. *J Orthop Res* 2009.
2. Arakawa K, Arakawa H, Hueston CM, Deak T. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on central expression of interleukin-1 evoked by stress in female rats. *Neuroendocrinology*. 2014;100(2-3):162-77. PubMed PMID: 25300872.
3. Hong L, Sultana H, Paulius K, Zhang G. Steroid regulation of proliferation and Biochem Mol Biol. 2009 Apr;114(3-5):180-5. PubMed PMID: 19429449. Pubmed Central PMCID: 2682591.
4. Calis M, Demirtas TT, Atilla P, Tatar I, Ersoy O, Irmak G, et al. Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue-engineering study. *Plastic and reconstructive surgery*. 2014 Apr;133(4):499e-510e. PubMed PMID: 24675202.
5. Sample SJ, Racette MA, Hao Z, Thomas CF, Behan M, Muir P. Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. *PloS one*. 2012;7(9):e43215. PubMed PMID: 22984413. Pubmed Central PMCID: 3439425.
6. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, Perka C, Duda GN, Kasper G. Sex-specific compromised bone healing in female rats might



be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. Bone. 2009 Dec;45(6):1065-72

7. AM Riordan, R Rangarajan, JW Balts, WK Hsu, PA Anderson. Reliability of the Rabbit Postero-Lateral Spinal Fusion Model: A Meta-Analysis. JOR 2013

8. Mapara M, Thomas BS, Bhat KM/ Rabbit as an animal model for experimental research. Dent Res J (Isfahan). 2012 Jan-Mar; 9(1): 111-118

9. Copeland S, Warren HS, Lowry, SF, Calvano SE, Remick D. Acute Inflammatory Response to Endotoxin in Mice and Humans. Clin Diagn Lab Immunol. 2005 Jan; 12(1): 60-67

10. Jacquier V, Estellé, Schmaltz-Panneau B et al. Genome-wide immunity studies in the rabbit: transcriptome variations in peripheral blood mononuclear cells after in vitro stimulation by LPS or PMA-Ionomycin. BMC Genomics 2015, 16:26

---

### 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.

#### Replacement

The biological coatings we would like to test are thought to stimulate bone formation due to their immunogenic properties.

The complexity of the bone environment and the interaction between immune and bone cells are difficult to mimic in vitro. Although we and others try to predict their effects on bone cells in vitro [1], their actual effects on bone tissue in vivo effects seem to be very different [3,4]. However, in vitro studies are still performed where possible, for instance to determine the optimal coating methods for the in vivo studies. For this purpose, the differentiation of stem cells into bone cells can be tested on the different coated constructs in vitro.

#### Reduction

Although the spinal fusion model requires relatively large group sizes to demonstrate statistically significant differences, there are a number of ways by which the number of rabbits can be reduced.

First, ectopic implantations can be performed in parallel so that multiple research questions can be answered within one experiment. The ectopic screening model allows for a large number of implants to be studied. We have previously used up to 18 samples in rabbits. Furthermore, the subcutaneous and

intramuscular locations can be easily studied in parallel.

Second, mechanistic studies are first performed in a screening setting ectopically. As the spinal fusion requires large group sizes, only the optimal conditions will be tested here. As such, 2-3 groups in total are sufficient.

Third, spinal fusion at two vertebral levels means that 2 treatments can be compared to the control in the same study.

#### Refinement

- Skin wounds will be sutured intracutaneously, using resorbable sutures
- Animals are housed together as much as possible
- Food is given ad libitum (pellets and hay)
- Animals are weighed weekly to monitor health
- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes during surgery
- During and after surgery the animals will be placed on heat blankets
- Animals will receive adequate anaesthetics to prevent harm during surgery
- Analgesia medication will be administered until 2 days after surgery to prevent harm post-operatively
- Daily scoring of the animals after the operations. Pain medication will be continued if necessary. For rabbits, this is a standard procedure after the OR

#### References:

1. Mo et al. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. BMC Cell biology. 2008.
2. Croes et al. Proinflammatory Mediators Enhance the Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells after Lineage Commitment. Plos One. 2015.
3. Croes et al. Local inflammation and bone formation in a new translational animal model. In preparation.
4. Croes et al. Bacterial infection increases bone volume in a rabbit osteomyelitis model. Submitted.

---

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.

The animals will have at least 1 week to acclimatize to the new environment before surgery. Animals will be given food and water ad libitum. The rabbits will be monitored for the respiratory and heart function by the designated biotechnician. The animals will be placed on heat blankets postoperatively. The animals will be returned to routine housing after they have recovered from anesthesia. For specific information see 'refinement'.

The animals will be housed conform the standards of the GDL Utrecht. They will be housed in groups of two as much as possible. This has been done for female New Zealand White rabbits and male Fischer rats in the past, usually without problems. In cases when animals show signs of aggression towards each other, the animals will be housed individually to prevent harm.

The animals are weighed weekly by the animal care takers or researcher and monitored weekly (written and signed off in the working plan). This observation frequency is higher (once daily) after the surgeries. When weight loss is suspected later in the experiment, the animals will be monitored for the humane

endpoints and weighed daily.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Cumulative moderate (matig) stress is estimated based on the following procedures:

-Operations: moderate stress. Due to anesthetics and ectopic implantation of samples and implantation next to the spinal column. Animals may experience pain in the dorsum after the operation. When autologous bone is used, the animals may experience pain in the hip bone from bone harvesting. Animals will have reduced food intake and have weight loss due to the operations.

-Daily scoring of animals after the operation: mild stress due to handling.

-Injection of pain medication subcutaneously: mild stress due to handling and injection.

-Injection of fluorochrome markers subcutaneously (max. 3 times depending on duration of experiment): moderate stress caused by handling and local irritation of the skin (procedure causes mild stress, but considered as moderate as it is repeated).

-In vivo micro-CT scans (max.3 times depending on duration of experiment): moderate moderate stress due to handling and anesthetic induction (procedure causes mild stress, but is considered as moderate as it is repeated)

-Blood harvest (rabbits, max. 5 times depending on studied factor and duration of experiment): moderate due to handling and ear irritation (procedure causes mild stress, but it is considered as moderate as it is repeated).

Euthanasia: mild stress due to handling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

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

1. At least 1 week to acclimatize to the new environment before surgery
2. Adequate use of injection anesthetics during the implantation procedure
3. The depth of narcosis (twitching/movement) can also be observed by the researcher performing the procedure. In the case of rabbits, the respiratory and heart function will be monitored by the biotechnician assisting with the anesthetics during the OR.
4. Adequate observation of vital signs of the animals post-operatively. Scoring of the animals daily after operations by the animal caretakers and the researcher.
5. For euthanasia, one of the methods listed in Appendix IV of directive 2010/63/EU is used
6. Pain medication, starting before the operation, and continued for two days as standard. If there is an indication, pain medication will be extended.

### **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.

- The animals will be euthanized in case one or more of the following humane endpoints are observed:
- Weight loss. When weight loss is suspected (reduced food intake), the animals will be weighed daily to monitor welfare
- Severe lethargy
- Severe tachycardia
- Severe tremor
- Loss of the animals' ability to walk and feed themselves
- Persistent infection of wounds.
- 

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

Rats: not expected.

Rabbits: very unlikely, max. 5%.

#### **K. Classificatie van ongerief**

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

The procedure is classified as moderate (matig).

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

The animals need to be euthanized to harvest the implants (ectopic model) for histology.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.II.548.037
2. Titel van het project : Slimme coatings voor orthopedische implantaten
3. Titel van de NTS : Slimme coatings voor orthopedische implantaten

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 09-10-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 21-10-2015 en 16-12-2015  
 anderszins behandeld: per mail: 24-12-2015  
 termijnonderbrekingen van / tot : 23-10-2015 tot 04-12-2015  
18-12-2015 tot 23-12-2015  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 18-02-2016

## 7. Eventueel horen van aanvrager

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

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 23-10-2015
- Strekking van de vragen:

Projectvoorstel:

- 3.1 Achtergrond

De DEC is verbaasd over het feit dat referenties ontbreken naar het werk van uw eigen groep gezien uw werk de afgelopen jaren in het konijnenmodel. Wat is hiervoor de reden?

- 3.2 Doel

Belangrijk is dat u een en ander dusdanig formuleert dat er sprake is van 1 onderzoeksdoel met meerdere subdoelen. Niet 3 doelen dus. Graag aanpassen.

- 3.2 en 3.3

Op verschillende plaatsen in de tekst noemt u 'biofunctional molecules', 'bone-stimulating' factors etc. zonder dat u deze benoemt. Dit moet beslist wel gedaan worden, zeker ook in de bijlagen. Graag ook aangeven dat u in het kader van dit project hier geen onderzoek aan doet, maar vaart op eigen gegevens uit andere projecten.

- 3.4.1

U schrijft: 'Finally, the rabbits immune system is more comparable to humans allowing for lower bacterial doses to be used'. Dit zult u anders moeten formuleren.

- 3.4.3.

- Welke *S. aureus* stam gebruikt u?

- Phase 3: De zin 'In vivo studys will be performed etc.' is onbegrijpelijk, graag anders formuleren.

- Phase 4: Waarop is de  $1 \times 10^5$  CPU *S. aureus* bij het konijn gebaseerd? Graag referentie geven.

Bijlage algemeen:

Graag voor alle studies motiveren waarom u extra dieren nodig heeft.

Bijlage 1:

- Pagina 5: Pilot studie in ratten. Beter uitleggen wat de read-out is, en wat te verstaan onder een 'reproducible infection of the implant'.

- Een keer de afkorting NT verklaren.

- Pagina 6: Groeifactoren in antibiotica benoemen.

B. De dieren

- Pagina 7: Verwijderen zin: 'As an advantage, we have experienced...', want waarom neemt u dan geen Fisher ratten?

- Zijn de konijnen niet te jong? Is het groeiproces niet van invloed op uw data? Advies: volwassen dieren gebruiken.

Bijlage 2:

- Pagina 3: Ectopische implantaties: Wat is de ratio van de 2 steps implantatie?

- Pagina 5: Graag beter de extra dieren motiveren. Het is de DEC niet duidelijk waarom er geen extra dieren aangevraagd worden voor de spinal fusion experimenten.

#### B. De dieren

- U schrijft hier dat u werkt met Fischer ratten. Dit is niet consistent met bijlage 1.
- Ook hier weer de leeftijd van de konijnen motiveren, wellicht volwassen konijnen gebruiken?

#### Niet Technische Samenvatting

- Is de looptijd van 5 jaar wel reëel? Indien van toepassing gaarne aanpassen.
- Datum antwoord: 04-12-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

#### Projectvoorstel:

- 3.1 Achtergrond  
We hebben een aantal referenties toegevoegd. Daarnaast refereren we naar eigen werk dat nog niet gepubliceerd is, maar dat hebben we voor de zekerheid bewaard voor de bijlage 2 in verband met de confidentiality.
- 3.2 Doel  
Akkoord, dit is aangepast.
- 3.2 en 3.3  
We hebben de tekst gewijzigd zoals u suggereert. We hebben daarnaast de term 'bacterial killing element' overal vervangen door 'inorganic nanoparticles', omdat dit specifiek is.
- 3.4.1  
Dit hebben we gewijzigd, hetzelfde geldt voor dezelfde formulering in de bijlagen.
- 3.4.3  
Dit is waarschijnlijk ATCC 6538, omdat momenteel de in vitro experimenten hiermee gedaan worden. Dit hebben we er nu bij vermeld.
- Phase 3: Akkoord
- Phase 4: Binnen onze groep is een pilotstudie gedaan om de dosis *S. aureus* te bepalen (DEC2012.III.04.037-C2). Deze data zijn niet gepubliceerd. Hierbij zijn bacteriële doses variërend van  $10^2$  tot  $10^6$  CFU getest. Bij  $10^5$  CFU was bij alle konijnen na een maand een infectie te zien. Bij  $10^6$  CFU was er sprake van een hematogene infectie.

#### Bijlage algemeen:

We hebben het nu bij elke studie vermeld.



### Bijlage 1:

- Pagina 5: We zijn op zoek naar de minimale dosis *S. aureus* waarvoor een chronische infectie wordt waargenomen, gedefinieerd als de aanwezigheid van bacteriën in het bot na 4 weken. We spreken van een reproduceerbaar effect als een actieve infectie wordt aangetoond in alle drie de dieren van de groep.
- Pagina 6: Akkoord

### B. De Dieren

- Pagina 7: Deze zin hebben we verwijderd, voor het infectiemodel worden inderdaad Sprague Dawley ratten gebruikt. Voor deze ratten geldt echter ook dat ze sociaal gehuisvest kunnen worden.
- We hebben in het verleden altijd adolescente konijnen gebruikt. Uit de literatuur kunnen we niet opmaken dat volwassen konijnen beter zouden zijn. Voor ons biedt een kleiner konijn het voordeel dat deze in het micro-CT-apparaat past waardoor in vivo scans gemaakt kunnen worden. Deze overwegingen hebben we nu vermeld in de aanvraag.

### Bijlage 2:

- Pagina 3: Het is ons onduidelijk wat precies de vraag is, maar wellicht gaat het om de duur van de twee operaties. De eerste operatie (implantatie van de spacers) duurt ongeveer 1 uur. De tweede operatie (implantatie van de geladen constructen) duurt ongeveer 1.5 uur. Door eerst een spacer te implanteren, wordt een holte gecreëerd, omgeven door een membraan. Dit membraan zorgt voor een meer gelokaliseerde ontstekingsreactie, omdat het de diffusie en het lekken van ontstekingsfactoren naar het omliggende weefsel moet beperken. Dit membraan is deels gekarakteriseerd, maar we willen additionele experimenten doen om de eigenschappen van het membraan in kaart te brengen. We hebben bij de omschrijving van het diermodel nu wat meer details gegeven en een bron toegevoegd.
- Pagina 5: We hebben deze zin weggehaald om verwarring te vermijden. We vragen voor de spinal fusion model wel degelijk extra dieren aan rekening houdend met 5-6% uitval van dieren. Alle dieren ondergaan beide procedures.

### B. De dieren

- Voor het infectiemodel (bijlage 1) gebruiken we Sprague-Dawley ratten, omdat deze het meest beschreven worden in de literatuur. Voor de wervelfusie en ectopische modellen gebruiken we Fischer ratten. Voor botvorming studies hebben we veel ervaring met Fischer ratten, met name bij het gebruik van calcium fosfaten en BMP-2 groeifactor. De hoeveelheid botvorming bij de gekozen tijdstippen kan daarom goed voorspeld worden.
- Hoewel de spinal fusion rate misschien niet veel wordt beïnvloed door de leeftijd, zijn we het ermee eens dat het verstandiger is om volwassen konijnen te gebruiken. In de literatuur worden met name konijnen van 6 maanden of ouder gebruikt. Dit weegt naar onze mening op tegen het criterium dat de konijnen in vivo gescand kunnen worden in de micro-CT

apparaat. Met zulke grote konijnen moet het namelijk nog blijken of dit inderdaad praktisch haalbaar is. Dit is aangepast

#### Niet Technische Samenvatting

- Een looptijd van 5 jaar lijkt ons reëel. Er zijn technieken die nog ontwikkeld moeten worden en vervolgens in vitro getest moeten worden. We hebben dit benadrukt in het projectvoorstel (3.2).
- Datum: 18-12-2015
- Strekking van de vragen:

#### Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is de DEC niet direct duidelijk waarop de uitval met betrekking tot de spinal fusion gebaseerd is. Graag toelichten.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC adviseert het argument met betrekking tot anesthesie te verwijderen, omdat dit tegenwoordig niet meer voorkomt.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De motivatie voor het extra aantal dieren graag overleggen en aanpassen in samenspraak met de IVD.
- Datum antwoord: 23-12-2015
- Strekking van de antwoorden:

#### Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Voor de konijnen beschrijft men in de literatuur voornamelijk uitval als gevolg van infecties of complicaties gerelateerd aan de isolatie van autoloog bot uit de bekkenkam (e.g. bloedverlies, verlamming). In onderstaande referenties beschrijft men gemiddeld gezien een uitval van 8%. Omdat maar een deel van de konijnen autologe bottransplantatie zal ondergaan in onze studies (ongeveer één derde), denken we dat een gemiddelde uitval van 5% gezien over alle konijnen een realistische schatting is. Voor de ratten hebben we de extra dieren verwijderd uit de aanvraag voor de spinal fusion gedeelte, aangezien deze complicaties minder een rol lijken te spelen hier. Bij de ratten zal geen autoloog bot geïsoleerd worden. Deze motivatie hebben we nu in de bijlage vermeld.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: We hebben dit argument weggehaald, we zijn het ermee eens dat dit niet de belangrijkste reden van uitval is.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Zie hierboven de uitleg voor bijlage 2 (spinal fusion). Voor bijlage 1 (infectie model) hebben we in samenspraak met de IVD het aantal extra dieren per experiment aangepast. Op basis van de literatuur hebben we het percentage extra dieren verhoogd van 5% naar 10%. Hoewel de exacte reden van uitval van

de ratten in deze papers niet wordt genoemd, zegt onze ervaring in konijnen dat sepsis na *S. aureus* infectie (2013.III.11.083 60 dieren) een belangrijke reden hiervoor is. Deze motivatie hebben we nu in de bijlage vermeld. Voor de pilotstudie is het percentage uitval verhoogd naar 20%, omdat overdosering met *S. aureus* hier nog een rol kan spelen.

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

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

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

### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

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

### **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
  - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
  - wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. In 10% van de gevallen waarbij een botimplantaat in kleine botdefecten geplaatst wordt is de ingreep niet succesvol, doordat bacteriën – ondanks adequate voorzorgsmaatregelen – tijdens de operatie aan het implantaat hechten en het vervolgens infecteren, en/of doordat het implantaat onvoldoende integreert in het omliggende botweefsel. De aanvrager wil met behulp van een model voor implantaatinfectie (bijlage 1) onderzoeken of het mogelijk is om multifunctionele coatings te ontwikkelen die zowel het hechten en uitgroeien van bacteriën voorkomen, alsook botgroei stimuleren. Daarnaast wil de aanvrager met behulp van een *spinal fusion* model (bijlage 2) onderzoeken of de coatings ook geschikt zijn voor toepassing bij grote botdefecten. Grote botdefecten kunnen alleen genezen met behulp van uitgebreide *de novo* botvorming, en de gouden standaard om

dit te bewerkstelligen is het plaatsen van autoloog bot. *Spinal fusion* is een erkend model voor onderzoek naar stimulatie van *de novo* botvorming, en een veel voorkomende indicatie voor transplantatie van autoloog bot bij patiënten. De zogenaamde 'slimme coatings' die met behulp van dit project ontwikkeld worden kunnen mogelijk het succes van botimplantaties vergroten, en de negatieve gevolgen van infectie, onvoldoende integratie van een implantaat en het oogsten van autoloog bot (zoals pijn, invaliditeit en heroperaties) voorkomen. Het belang van de doelstelling wordt door de DEC ingeschat als substantieel.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het project is opgedeeld in logisch op elkaar volgende fasen met duidelijke go/no-go momenten. In bijlage 1 worden verschillende experimenten uitgevoerd in een model voor implantaatinfectie in ratten en konijnen, waarbij van verschillende coatings de antibacteriële effecten en stimulatie van botgroei richting een aangebracht implantaat bestudeerd kunnen worden. Eerst zal het reeds in konijnen gevalideerde model voor toepassing in ratten geoptimaliseerd worden (fase I). Vervolgens wordt de werkzaamheid van coatings die in *in vitro* experimenten veelbelovende resultaten lieten zien in ratten onderzocht (fase II en III). (NB de *in vitro* experimenten zijn geen onderdeel van deze projectaanvraag). In fase II wordt de werkzaamheid van coatings met antibacteriële componenten in ratten bestudeerd. De experimenten van fase III – waarin de componenten met een antibacterieel effect gecombineerd worden met groeifactoren – worden alleen uitgevoerd, wanneer *in vitro* experimenten hebben laten zien dat de combinatie van deze componenten effectiever is dan de antibacteriële componenten alleen. Alleen coatings die in fase II en/of III werkzaam bleken te zijn worden vervolgens ook in konijnen onderzocht (fase IV). In bijlage 2 worden verschillende experimenten uitgevoerd met behulp van een *spinal fusion* model in ratten en konijnen, waarbij het vermogen van coatings om *de novo* botvorming te stimuleren bestudeerd kan worden. In eerste instantie wordt de werkzaamheid van de coatings in ratten onderzocht (fase V). Ook hier geldt dat alleen coatings die in ratten werkzaam bleken te zijn vervolgens ook in konijnen onderzocht worden (fase VI). De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Gefokt voor dierproeven (11)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Huisvesting en verzorging
  - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Bij alle dieren van de bijlagen 1 en 2 zullen een of meerdere implantaten aangebracht worden. Het ongerief ten gevolge van de daarvoor noodzakelijke chirurgische ingrepen wordt ingeschat als matig. Andere experimentele ingrepen die uitgevoerd zullen worden (zoals fluorochroom injecties, bloedafnames, oogsten van autoloog bot en herhaaldelijk bijkomen uit anesthesie ten behoeve van imaging) leiden ook tot matig ongerief. In bijlage 1 wordt bij alle implantaten een lokale infectie geïnduceerd. Men houdt er rekening mee dat deze infectie ook systemische effecten kan hebben, en dat maximaal 10% van de ratten (en maximaal 20% in de pilotstudie) en 5% van de konijnen ten gevolge hiervan het humane eindpunt zullen bereiken. Bij de experimenten beschreven in bijlage 2 zullen complicaties na het oogsten van autoloog bot bij maximaal 5% van de konijnen leiden tot het bereiken van het humane eindpunt. Aangezien bij de ratten geen autoloog bot zal worden geogst wordt niet verwacht dat een of meerdere ratten het humane eindpunt zullen bereiken.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Antibacteriële en botgroeistimulerende effecten van de te onderzoeken coatings worden in eerste instantie met behulp van *in vitro* experimenten onderzocht. Vervolgens worden de effecten van de meest veelbelovende coatings in een *in vivo* setting getest, omdat eerder uitgevoerde experimenten hebben uitgewezen dat resultaten van *in vitro* experimenten onvoldoende voorspellende waarde hebben voor effecten die *in vivo* waargenomen kunnen worden. Interacties tussen componenten van de coatings, immuuncellen en botweefsel liggen ten grondslag aan de antibacteriële en botgroeistimulerende effecten van de coatings. Deze interacties zijn dusdanig complex, dat ze niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden. Het is bijvoorbeeld niet mogelijk om botvorming *in vitro* te bewerkstelligen. Wel is het mogelijk om te onderzoeken in hoeverre bepaalde componenten van de coatings in staat zijn om differentiatie van stamcellen tot botcellen te stimuleren. Dergelijk voorbereidend werk wordt in de voorliggende projectaanvraag *in vitro* uitgevoerd, voordat men overgaat tot de beschreven dierexperimenten. In verband met de opzet en de risico's van het onderzoek (zoals het aanbrengen van geïnfecteerde implantaten) en de aard van de benodigde gegevens (zoals morfologisch onderzoek van implantaten en omliggend weefsel) is het niet mogelijk om het onderzoek in mensen uit te voeren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het optimale aantal dieren per groep wordt voorafgaand aan de experimenten bepaald door powerberekeningen uit te voeren, waar mogelijk met behulp van gegevens uit eerder uitgevoerde *in vitro* en *in vivo* experimenten. Daarbij wordt rekening gehouden met het feit dat niet alle vergelijkingen die mogelijk zijn, ook daadwerkelijk gemaakt zullen worden. Zo wordt voorkomen dat de alpha teveel gecorrigeerd en daarmee de groepsgrootte onnodig groot wordt. Eerder uitgevoerde experimenten hebben uitgewezen dat het mogelijk is om in een dier meerdere ectopische implantaten en orthotope implantaten aan te brengen. De

implantaten beïnvloeden elkaar niet, en het plaatsen van meerdere implantaten heeft geen negatieve gevolgen voor het dier. Op deze wijze kan het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten in bijlage 2 op verantwoorde wijze beperkt worden. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de beschreven diermodellen en bijbehorende analysemethoden. Het welzijn van de dieren wordt gedurende de experimenten nauwlettend in de gaten gehouden. Om ongerief zoveel mogelijk te beperken worden adequate – en op de betreffende ingreep/handeling afgestemde – analgesie- en anesthesieprotocollen toegepast. Wanneer na afloop van een chirurgische ingreep blijkt dat de dieren onvoldoende herstellen, dan worden ondersteunende maatregelen getroffen. Mocht een dier desondanks in conditie verslechteren en het humane eindpunt bereiken, dan wordt het geëuthanaseerd. Op deze wijze wordt getracht te voorkomen dat dieren meer dan matig ongerief ervaren.

In beide modellen worden de experimenten in eerste instantie in ratten uitgevoerd, omdat voor deze diersoort veel analytische hulpmiddelen beschikbaar zijn, waardoor een mechanistisch onderzoek naar de werkzaamheid van coatings mogelijk is. De coatings die de beste resultaten opleveren zullen vervolgens onderzocht worden in konijnen, omdat het konijn qua immuunsysteem meer overeenkomsten vertoont met de mens. Ook de grootte van de implantaten die aangebracht kunnen worden en de lagere dosis *Staphylococcus aureus* die een chronische infectie induceert geven een betere benadering van de situatie in de mens. Daarnaast is het mogelijk om in het *spinal fusion* model in konijnen de werkzaamheid van gecoate implantaten te vergelijken met de gouden standaard die in de kliniek toegepast wordt: de transplantatie van autoloog bot. Een dergelijke ingreep is bij ratten technisch lastig uitvoerbaar in verband met de grootte van de dieren.

In beide bijlagen zullen alleen mannelijke ratten worden ingezet, omdat de implantaten die bij vrouwtjes aangebracht kunnen worden een kleiner oppervlak hebben. Daardoor is het technisch lastig uitvoerbaar om de te onderzoeken coatings aan te brengen. In beide bijlagen zullen alleen vrouwelijke konijnen ingezet worden, omdat dit een goede vergelijking met resultaten uit eerdere experimenten mogelijk maakt. Bijkomend voordeel is dat vrouwelijke konijnen in groepsverband gehuisvest kunnen worden. Daarnaast is bekend dat het botmetabolisme in ratten en de *fusion rate* in konijnen tussen mannelijke en vrouwelijke dieren verschilt, waardoor het gebruik van beide geslachten zou leiden tot een aanzienlijke toename van de variantie en de bijbehorende benodigde groepsgroottes.

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

#### **D. Ethische afweging**

Op grond van de onder C genoemde overwegingen is de DEC van mening dat het belang van de doelstelling – het ontwikkelen van multifunctionele coatings, die zowel het hechten en uitgroeien van bacteriën op implantaten voorkomen, alsook botgroei stimuleren – substantieel is. Het projectvoorstel is vanuit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en de vertaling van onderzoeksresultaten naar de mens wordt mogelijk geacht. De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat de verschillende diermodellen en experimenten noodzakelijk zijn voor en leiden tot het bereiken van de doelstelling. Het gelijktijdig werken in de twee beschreven diermodellen acht de DEC een sterk punt, omdat het bestuderen van de twee verschillende vormen van botimplantatie die in de kliniek voorkomen een vollediger beeld geeft van de effecten die de coatings kunnen bewerkstelligen. De DEC is ervan overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven, mede doordat de onderzoeksgroep veel ervaring heeft met de beschreven diermodellen en het project is opgesplitst in logisch op elkaar volgende fasen met duidelijke criteria voor go/no-go beslissingen. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van het voorliggende onderzoek opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren zullen ondervinden, en acht het gebruik van de dieren voor dit project ethisch aanvaardbaar.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

#### **Dierexperimentencommissie Utrecht**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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  
AVD115002016445

**Bijlagen**

2

Datum 24 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016445. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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



Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: PhD Onderzoeker  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [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 januari 2016  
Geplande einddatum: 1 januari 2021  
Titel project: Smart coatings for orthopedic implants  
Titel niet-technische samenvatting: Slimme coatings voor orthopedische implantaten  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec.utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

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

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

19 februari 2016

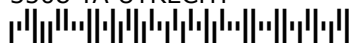


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

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  
AVD115002016445

**Bijlagen**

2

Datum 24 februari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 24 februari 2016

Vervaldatum: 25 maart 2016

Factuurnummer: 16700445

Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002016445	€ 741,00

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

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 23 maart 2016 9:41  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** aanvraag AVD115002016445

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag voor vergunning ingediend. Het betreft uw project "Smart coatings for orthopedic implants" met aanvraag nummer AVD115002016445. In de bijlagen dierproeven is het aantal dieren niet consistent weergegeven. Wij willen u vragen dit met elkaar in overeenstemming te brengen.

In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u onder A. een totaal van 66 ratten en 70 konijnen en onder B. 70 ratten en 70 konijnen.

In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u onder A. een totaal van 294 ratten en 176 konijnen en onder B. 279 ratten en 176 konijnen.

Wij gaan ervan uit dat de onder A. genoemde aantallen correct zijn omdat dit ook overeen komt met de NTS, wanneer dit niet zo is, dan verzoeken wij u om ook de NTS aan te passen.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**

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

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

T: 0900 2800028

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



Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres  
Bolognalaan 50  
3584 CJ Utrecht

postadres  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

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

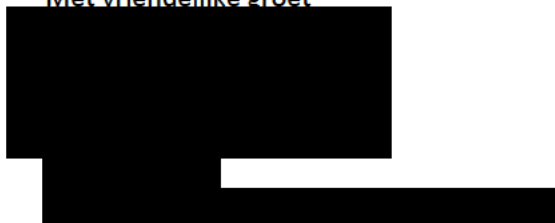
uw kenmerk  
ons kenmerk

datum 29 maart 2016  
onderwerp Antwoorden AVD115002015445

Mijne Dames en Heren,

Naar aanleiding van uw mail d.d. 23 maart 2013, zend ik u bijgaand de gecorrigeerde bijlagen van bovenstaand project. Uw veronderstelling dat de aantallen on der A correct waren, is juist.

Met vriendelijke groet





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Implant infection model in rats and rabbits</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Implant infection model in rats and rabbits
Volgnummer	Type dierproef				
1	Implant infection model in rats and rabbits				

*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.

We would like to use a rat and rabbit model of an implant-related infection [1]. In this model, a metal implant is inserted in the tibiae of the animals while it is in the meantime inoculated with a specific dose of bacteria [2]. We will use *S. aureus* to induce a chronic infection, as this is a clinically relevant strain which is often associated with biofilm formation [3]. As we are using *S. aureus* ATCC 6538 for our in vitro studies, we will likely also use this strain for the animal studies. A pilot study will be performed in the rat model to determine the minimal dose of *S. aureus* needed to induce a chronic infection. For the rabbit model, such a pilot has already been performed within our group. As such, a dose of  $10^5$  CFU will be used. After several weeks (4 weeks normally, and 8 weeks when long-term effects are studied) [1], the number of bacteria can be quantified as a measure of bacterial killing (bacterial culture and



histology). Furthermore, bone formation around the implant is quantified to determine the bone-implant integration (micro-CT imaging and histology) [2].

The bacterial-killing activity and bone-stimulating activity of our implant coatings will be compared to untreated control implant. In our experiments, we would like to test titanium nanotubes [4], inorganic nanoparticles (e.g. zinc and silver) [5, 6], and layer-by-layer coatings [7] for their bacterial-killing and bone-stimulating activity. Growth factors such as the bone morphogenetic proteins can be used together with the inorganic nanoparticles to promote bone formation in the layer-by-layer coatings.

We will perform initial studies in rats, which have shown to be a very suitable animal model for this purpose due to their size allowing implant placement, easy handling, and the establishment of chronic infection with clinically-relevant bacterial strains [1]. When successful coatings are identified, we would also like to test their efficacy in the rabbit model. The rabbit model, due to their more comparable immune system to humans, is superior to the rat model in a translational aspect [8,9]. Lower doses of bacteria can generally be used in rabbits than in rats, which are more comparable to the clinical situation [1]. For the same reason, in addition to bacterial-killing and bone-implant integration, the rabbit model is a superior model to study local and systemic markers of inflammation. Finally, larger-size implants can be tested which allow for more surface modification.

The different experiments can be summarised as follows:

- test coatings with inorganic nanoparticles (e.g. zinc and silver) in rats. The different elements will be incorporated into titanium nanotube coatings. To embed silver nanoparticles in titanium oxide nanotubes, two different concentrations (0.5 and 1.5 M) of AgNO<sub>3</sub> will be used [5]. Also two different concentrations (0.015 and 0.030M) of Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> will be used [6]. We are currently testing the in vitro bacterial-killing activity of these elements. The animals will be euthanized after 4 weeks.
- test the controlled release of the aforementioned nanoparticles in rats. For this purpose, a thin layer of thermo-sensitive hydrogel will be used in combination with the nanotubes. As we are also interested in the more long-lasting effects of these coatings, animals will be euthanized at two different time points (4 and 8 weeks).
- test a layer-by-layer designed coating with dual purpose, e.g. bacterial-killing and stimulating bone-implant integration in rats. These layers consist of antimicrobials (e.g. antibiotics like gentamicin)[10] and growth factors (e.g. bone morphogenetic proteins)[11]. Here, also two different concentration from each agent will be studied in the same rat model. These components will be tested alone, or in combination, to determine the coating with best bacterial-killing and bone-stimulating activity. We are currently still developing the technology to produce the layer-by-layer coatings. If this is successful, in vitro release profile of layer-by-layer components will be determined. Depending on the release profile that can be obtained in vitro, the animals will be euthanized after either 4 or 8 weeks.
- test the most promising conditions in the rabbit model. The rabbit model is a more clinically relevant model because lower doses of *S. aureus* can be used [1]. Furthermore, larger-size implants can be tested which allow for more surface modification. The same analyses will be performed as in the rats. In addition however, blood samples are harvested to measure systemic markers of inflammation. Local signs of inflammation are quantified by histology and cytokine measurements on tissues harvested locally. In this study, the rabbits are euthanized at 4 and 8 weeks to also test the long-lasting effects of the coatings.

## REFERENCES

- [1] Reizner, JG Hunter, NT O'Malley, RD Southgate, EM Schwarz, SL Kates. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur Cell Mater.* 2014 Mar 25;27:196-212.
- [2] Moojen DJ, Vogely HC, Fleer A, Nikkels PG, Higham PA, Verbout AJ, Castelein RM, Dhert WJ. Prophylaxis of infection and effects on osseointegration using a tobramycin-periapatite coating on titanium implants--an experimental study in the rabbit. *J Orthop Res.* 2009 Jun;27(6):710-6.
- [3] Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, Giannini S, Arciola CR. Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* 2011 Nov;6(11):1329-49
- [4] Gao A, Hang R, Huang X, Zhao L, Zhang X, Wang L, et al. The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts. *Biomaterials* 2014;35:4223-35.
- [5] Zhao L, Wang H, Huo K, Cui L, Zhang W, Ni H, et al. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011;32:5706-16.
- [6] Liu W, Su P, Chen S, Wang N, Ma Y, Liu Y, et al. Synthesis of TiO<sub>2</sub> nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. *Nanoscale* 2014;6:9050-62.
- [7] Necula BS, Fratila-Apachitei LE, Zaat SAJ, Apachitei I, Duszczuk J. In vitro antibacterial activity of porous TiO<sub>2</sub>-Ag composite layers against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomaterialia* 2009;5:3573-80
- [8] Bosze, Z. and Houdebine, L.M. (2006) Application of rabbits in biomedical research: a review. *World Rabbit Sci.* 14:1-14.
- [9] Dharmadhikari, A. and Nardell, E.A. (2008) What animal models teach humans about tuberculosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39:503-508.
- [10] Cosgrove SE, Vigliani GA, Fowler VG Jr, Abrutyn E, Corey GR, Levine DP, Rupp ME, Chambers HF, Karchmer AW, Boucher HW. Initial low-dose gentamicin for *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis is nephrotoxic. *Clin Infect Dis.* 2009 Mar 15;48(6):713-21
- [11] Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop.* 2007 Dec; 31(6): 721-727.

---

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.

Rats:

Surgical procedure- the left hind leg is shaven and disinfected with povidone iodine. An incision is made to the anteromedial aspect of the tibia. To access the medullary cavity, a hole between the tibial plateau and the tibial tuberosity is drilled with a smooth stainless steel pin (K-wire) through the cancellous bone of the proximal metaphysis. The K-wire is inserted into the medullary cavity and pushed forward distally to create space in the cavity. After removal, a small volume of either saline or bacteria are injected into the medullary cavity by a microsyringe. After bacterial inoculation, the differently coated K-wires are inserted and the skin and fascia are sutured with resorbable sutures. The surgeries are estimated to take half an hour. In vivo scanning is performed with appropriate anesthetics (max. 3 times depending on the duration of the experiment). Fluorochrome markers are injected subcutaneously (max. three time points depending on the duration of the experiment) to determine the onset and development of bone formation. The animals are euthanized after 4 or 8 weeks depending on the coating which is tested.

Anesthetics- start and maintained with isoflurane/oxygen

Pain management-injection analgetics (usually buprenorphine with 12 hour interval), starting before surgery and continued after surgery. The protocol will be developed in consultation with the designated veterinarian. If there is any indication that the rats continue to suffer pain, the pain medication will be prolonged.

Antiseptic techniques- Surgery will be performed under aseptic conditions. The skin will be disinfected with povidone iodine. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves, and a surgery mask/cap. Only autoclaved instruments will be used.

Postoperative care- The animals will be placed on heat blankets. The animals will be housed per two if possible. The animals will be scored daily for well-being in the first week, and weekly thereafter. The rats will receive special food if they have reduced food intake due to the surgery and the pain medication.

Infection measurements- In vivo scanning under isoflurane anesthetics is performed for a maximum of 3 times in total. Bacterial culture of bone and implant after euthanization is the primary outcome measure for bacterial killing. Local inflammation markers will be measured on tissue samples.

Bone formation measurements- Bone-implant contact as determined on histology and aforementioned in vivo scans. The incorporation of fluorochromes is assessed by fluorescence microscope. This will elucidate the onset and progression of bone formation around the implant.

Euthanasia protocol- One of the methods listed in appendix IV of directive 2010/63/EU. The rats will be euthanized at 4 or 8 weeks after start of the experiment with an overdose of CO2 inhalation.

Rabbits:

Surgical procedure- The left hind leg is shaven and disinfected with povidone iodine. The stifle joint is opened with an incision through the skin and the patellar tendon. A hole is drilled into the tibia through the cartilage layer with a hand drill. The bacteria are inoculated into the cavity in a small volume with a pipette. A coated titanium implant is press-fit into the cavity, flushed with the cartilage surface. The patellar tendon and the skin are closed with resorbable sutures. The surgeries are estimated to take half an hour. In vivo micro-CT scanning is performed with appropriate anesthetics similar to the surgery (up to 3 times). Fluorochrome markers are injected subcutaneously to determine the onset and progression of bone formation (max. at 3 different time points). Blood is drawn from the ear vein (at max. 5 time points) to measure systemic markers of inflammation. The animals are euthanized after 4 and 8 weeks.

Anesthesia- Combination of injection analgetics/anesthetics (in consultation with the designated veterinarian).

Pain management- Injection analgetics (usually buprenorphine with 12 hour interval), starting before surgery and continued after surgery (in consultation with the designated veterinarian). If any signs of pain continue, pain medication will be prolonged.

Antiseptic techniques- Surgery will be performed under aseptic conditions. The skin will be disinfected with povidone iodine. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves, sterile gown, and a surgery mask/cap. Only autoclaved instruments will be used.

Postoperative care- The animals will be placed on heat blankets. The animals will be housed per two if possible. The animals will be scored daily for well-being in the first week and weekly thereafter. The rabbits will receive special food (soaked in water) when food intake is decreased (e.g. by systemic inflammation and as a side effect of the pain medication).

Infection measurements- In vivo scanning (under injection analgetics/anesthetics) is performed for a maximum of 3 times in total. Bacterial culture of bone and implant after euthanization is the primary outcome measure for bacterial killing. Systemic markers of inflammation are measured on blood samples.

Bone formation measurements- Bone-implant contact as determined on histology and aforementioned in vivo scans. The incorporation of fluorochrome marks will be determined by fluorescence microscopy to assess the onset and progression of new bone formation.

Euthanasia protocol- One of the methods listed in appendix IV of directive 2010/63/EU.

The rabbits will be euthanized after 4 and 8 weeks after the start of the experiment (usually with an overdose of Pentobarbital i.v.). This will be done under general anesthetics and pain medication, similar to the protocol used during surgery.

---

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

The following section describes the minimal number of animals needed for each study. For each study, a percentage of animals are added to the total to account for a possible loss of animals during the experiment. The percentage loss of animals is based on literature (rat experiments) or on our own experience with the same model and inoculation dose (rabbit experiments). Based on literature, a higher percentage loss is expected in rats (10%) compared to rabbits (5%). Furthermore, we expect a higher percentage loss in the pilot study performed in rats, due to a higher chance of hematogenous infection. A pilot study has already been performed for the rabbit model by our group in the past.

STUDY 1, pilot study in rats (24 rats)

A pilot study will be performed to determine the minimal dose of *S. aureus* needed to get a chronic infection of the implant [1]. Although these doses are also described in literature [1], different experimental setting (bacterial culture conditions, materials, housing conditions) may affect the results. Our goal is not to demonstrate statistical significance differences. We believe the chosen group sizes will allow for the identification of the optimal bacterial dose. The minimal dose for which all three rats show the presence of bacteria in the bone after 4 weeks will subsequently be used to test the efficacy of the coatings.

Due to the relative higher chance of hematogenous infection for the higher CFU doses in this pilot study, a 20% of rats (4 rats) are added to the total to account for possible loss of animals.

- 1) Neg control (N=2)
- 2)  $10^2$  CFU *S. aureus* (N=3)
- 3)  $10^3$  CFU *S. aureus* (N=3)
- 4)  $10^4$  CFU *S. aureus* (N=3)
- 5)  $10^5$  CFU *S. aureus* (N=3)
- 6)  $10^6$  CFU *S. aureus* (N=3)
- 7)  $10^7$  CFU *S. aureus* (N=3)

For the following experiments, we will make an estimation of the the expected difference of the means and coefficient of variance will be based on the in vitro observations: 50% expected difference of the means and 50% coefficient of variance in bacterial killing. We will perform a one way ANOVA's with a Bonferroni post hoc correction. The alpha will be adjusted for the multiple comparisons of the experimental groups (specified next per individual experiment). A two sided test will be used. We will use the S. aureus dose as determined in the pilot study.

STUDY 2, the effect of inorganic nanoparticles (73 rats):

- 1) Untreated implant (N=11)
- 2) Implant with nanotubes (NT) (N=11)
- 3) Implant with NT + Silver (AgNO<sub>3</sub>, 0.5 M) (N=11)
- 4) Implant with NT + Silver (AgNO<sub>3</sub>, 1.5 M) (N=11)
- 5) Implant with NT + Zinc (Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.015 M) (N= 11)
- 6) Implant with NT + Zinc (Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.030 M) (N= 11)

The best performing concentration of each element (3/4 and 5/6) is compared to the NT control (group 2).

Using an adjusted 'alpha' of 0.025 (0.05/2), a power of 80%, and a two-sided test, we find that 11 animals are needed per group when considering the difference of the means and a coefficient of variance of both 50%. We add an extra 7 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. We believe that a loss of approximately 10%, due to systemic effects of infection, is a realistic estimation [2,3,4].

STUDY 3, the effect of controlled release of the inorganic nanoparticles (e.g. silver and zinc) (97 rats):

- 1) Implant with nanotubes (NT) (N=11 x 4 and 8 weeks)
- 2) Implant with NT + hydrogel (N=11 x 4 and 8 weeks)
- 3) Implant with NT + zinc in hydrogel (N=11 x 4 and 8 weeks)
- 4) Implant with NT + silver in hydrogel (N=11 x 4 and 8 weeks)

Groups 3 and 4 are compared to group 2 at the two different time points (no repeated measurements).

Using an adjusted 'alpha' of 0.025 (0.05/2), a power of 80%, and a two-sided test, we find that 11 animals are needed per group when considering the difference of the means and a coefficient of variance of both 50%. We add an extra 9 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. We believe that a loss of approximately 10%, due to systemic effects of infection, is a realistic estimation [2,3,4].

STUDY 4, the effect of layer-by-layer release of antimicrobials (e.g. gentamicin) and growth factors (e.g. BMP-2) (100 rats).

- 1) Untreated implant (N=13)
- 2) Implant + growth factor (e.g. BMP-2) low concentration (N=13)
- 3) Implant + growth factor (e.g. BMP-2) high concentration (N=13)
- 4) Implant + antimicrobial (e.g. gentamicin) low concentration (N=13)
- 5) Implant + antimicrobial (e.g. gentamicin) high concentration (N=13)
- 6) Implant + growth factor (e.g. BMP-2)/antibiotic (e.g. gentamicin) low concentration (N=13)

7) Implant + growth factor (e.g. BMP-2) /antibiotic (e.g. gentamicin) high concentration (N=13)

The best layer-by-layer designs will be compared to the effect of the individual components (group 6 vs. group 2 and 4; group 7 vs. group 3 and 5). Thus, 4 comparisons are made. Using an adjusted 'alpha' of 0.0125 (0.05/4), a power of 80%, and a two-sided test, we find that 13 animals are needed per group when considering the difference of the means and a coefficient of variance of both 50%. We add an extra 9 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. We believe that a loss of approximately 10%, due to systemic effects of infection, is a realistic estimation [2,3,4].

STUDY 5, the effect of the optimal bacterial-killing and bone promoting coatings (176 rabbits)

- 1) Untreated implant (N=12 x two time points)
- 2) Implant with nanotubes (N=12 x two time points)
- 3) Implant with Zinc or Silver (N=12 x two time points)
- 4) Implant with Zinc or Silver in hydrogel (N=12 x two time points)
- 5) Implant with growth factor (e.g. bone morphogenetic protein 2) (N=12 x two time points)
- 6) Implant with antimicrobial (e.g. gentamicin) (N=12 x two time points)
- 7) Implant with growth factor (e.g. bone morphogenetic protein 2)/antimicrobial (e.g. gentamicin) in layer-by-layer design (N=12 x two time points).

At each time point, group 4 is compared to group 3, and group 7 is compared to group 5 and 6 (no repeated measures). Thus, 3 comparisons are made. Using an adjusted 'alpha' of 0.0167 (0.05/3), a power of 80%, and a two-sided test, we find that 12 animals are needed per group when considering the difference of the means and a coefficient of variance of both 50%. We add an extra 8 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. Based on our previous experience with this model (DEC 2013.III.11.083), we believe that a loss of approximately 5% of the rabbits, due to the systemic effects of infection, is a realistic estimation.

In total, we will therefore need 294 rats and 176 rabbits.

## REFERENCES

- [1] Reizner, JG Hunter, NT O'Malley, RD Southgate, EM Schwarz, SL Kates. A systematic review of animal models for Staphylococcus aureus osteomyelitis. *Eur Cell Mater.* 2014 Mar 25;27:196-212.
- [2] Lucke et al. A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003 Oct 15;67(1):593-602.
- [3] Poepl et al. Daptomycin, Fosfomycin, or Both for Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Osteomyelitis in an Experimental Rat Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov; 55(11): 4999–5003.
- [4] Poepl et al. Efficacy of Fosfomycin Compared to Vancomycin in Treatment of Implant-Associated Chronic Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Osteomyelitis in Rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Sep; 58(9): 5111–5116.

---

## B. De dieren

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

---

#### Rats:

Male Sprague Dawley, age 12-16 weeks (Charles River) . We expect to use 294 rats (see Statistical Methods).

The rat is a good animal model for our screening studies due to their small size, low cost, and established models of developing osteomyelitis described in literature [1,2]. Sprague Dawley rats have been used most often. By selecting the Sprague Dawley rats, we can base our bacteria inoculation dose on the literature.

Male rats are preferred of their larger size, which allows for larger K-wires to be implanted into the tibia, offering a larger surface area of the coating. The age of the rats is subsequently selected to ensure enough space in the tibial cavity for the placement of the k-wires (0.8 Ø x 25). Furthermore, the estrogen levels in female rats can fluctuate due to stress and age [3], and can affect bone regeneration [3,4]. Furthermore, it has been shown that male and female rats show a difference in their bone metabolism [5, 6,7]. If male and female rats are studied in a mixed population, this will cause a strong increase in the observed variance. We therefore prefer to use male rats only. The male rats can be housed together without problems.

#### Rabbits:

Female New Zealand White, age 12-16 weeks (Charles River). We expect to use 176 rabbits (see Statistical Methods).

Our group has previously performed dose-response studies with *S. aureus* in this adolescent rabbit model. Female rabbits can be used, which allows for grouped housing. Although, based on literature, both male and female rabbits can be used for this kind of research, we would like to use a single sex of rabbits. First, this minimizes the variance in the experiments, allowing the use of less animals. Second, we can compare our data to the results we obtained previously with this model. The selected age of the rabbits allows for the implantation of more clinically relevant-size implants (4 mm Ø x 25 mm).

Furthermore, the adolescent age of the rabbits allows for in vivo scanning as this is problematic for larger animals, To our best knowledge, current literature does not suggest that adolescent rabbits may be more suitable as an osteomyelitis model than mature rabbits, or vice versa.

#### REFERENCES

1. W. Reizner, J.G. Hunter, N.T. O'Malley, R.D. Southgate, E.M. Schwarz, and S.L. Kates. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur Cell Mater.* 2014; 27: 196–212.
2. Patel M, Yuri Rojavin, Amir A. Jamali, Samantha J. Wasielewski, and Christopher J. Salgado. Animal Models for the Study of Osteomyelitis. *Semin Plast Surg.* 2009 May; 23(2): 148–154.
3. Hong L, Sultana H, Paulius K, Zhang G. Steroid regulation of proliferation and Biochem Mol Biol. 2009 Apr;114(3-5):180-5. PubMed PMID: 19429449. Pubmed Central PMCID: 2682591.
4. Calis M, Demirtas TT, Atilla P, Tatar I, Ersoy O, Irmak G, et al. Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue-engineering study. *Plastic and reconstructive surgery.* 2014 Apr;133(4):499e-510e. PubMed PMID: 24675202.
5. Sample SJ, Racette MA, Hao Z, Thomas CF, Behan M, Muir P. Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. *PloS one.* 2012;7(9):e43215. PubMed PMID: 22984413. Pubmed Central PMCID: 3439425.
6. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, Perka C, Duda GN, Kasper G. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone.* 2009 Dec;45(6):1065-72

---

### 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.

Replacement:

The effects of the implant coatings are first studied in vitro. For this purpose, we use a cytotoxicity assay. Also, bacterial proliferation and biofilm formation can be assessed in vitro. The best-performing conditions will subsequently be tested in vivo, as indirect effects by immune cells is hard to mimick in an in vitro model.

Reduction:

For each experiment, a power analysis will be performed to determine the minimum number of animals required. The inter-animal variation will be minimized so that smaller group sizes are needed to reach statistical significance. Rats with the same sex and age will be used.

By performing in vivo scanning in the animals, the effects of the infection on bone changes can be assessed at different time points without the need of different animals for different time points (not possible if bacterial culture has to be performed at different time points).

Refinement:

- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment
  - Animals have cage enrichment
  - Animals are weighed weekly to monitor welfare
  - Animals receive appropriate analgetics and anaesthetics (in consultation with the designated veterinarian)
  - The animals are housed together as long as no signs of aggression towards each other exist
  - Daily scoring of the animals will be performed after the surgeries. Pain medication will be continued if necessary. For rabbits, this is a standard procedure.
- For rats, the extra handling needed for scoring will be requested in the working protocol
- In vivo scanning will be performed under adequate anaesthetics (in consultation with the designated veterinarian)



- During and after surgery, the animals will be placed on heat blankets
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes of the animals during surgery
- Skin wounds will be sutured intracutaneously to prevent opening

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.

The animals will have at least 1 week to acclimatize to the new environment in the GDL. The animals will be housed per two as much as possible. The respiration of the rats will be monitored by the researcher during surgery. The rabbits will be monitored for respiratory and heart function by the designated biotechnician. The animals will be placed on heat blankets after surgery and returned to routine housing after recovery of anesthesia. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed after surgery. Food is given ad libitum. The animals will be scored weekly by the animal caretakers or the researcher (in consultation with each other). After surgeries, this frequency will be increased. In the case of unexpected complications, the animal caretakers and the designated veterinarian are consulted.

## 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.

These coating methods have been newly developed by our group. With the current literature, we are unable to predict the performance of our coating methods in an in vivo model.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Moderate stress (cumulative) is estimated based on the following procedures:

- Moderate stress due to the surgery. Animals will experience pain in the treated joint. The animals might avoid loading of the limb after surgery. Bacterial infection causes local and systemic signs of inflammation. Animals will have reduced food intake and experience weight loss after surgery. In previous experiments, the animals were loading the affected limb a few days after surgery.
- Analgetics: mild stress. Animals experience lameness and reduced food intake due to the injection analgetics.
- Scoring of the animals after surgery: mild stress. Extra handling of the animals for weighing and scoring
- In vivo scanning (max. 3 times depending on the duration of the experiment): mild to moderate stress. Due to handling and anesthetics.
- Euthanasia: mild stress due to handling
- Blood harvesting (rabbits, max. 5 times depending on the duration of the experiment): moderate stress due to local ear irritation and stress during handling (procedure is mild, but is considered as moderate because it is repeated)
- Fluorochrome injections (max. 3 times depending on the duration of the experiment): moderate stress due to local skin irritation and stress during handling (procedure is mild, but is considered as moderate because it is repeated)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

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

1. At least 1 week to acclimatize to the new environment
2. Adequate use of analgetics (in consultation with the designated veterinarian)
3. Adequate use of anesthetics (in consultation with the designated veterinarian)
4. Observation of vital signs during surgery.

rats: depth of narcosis, respiration, tail pinch test

rabbits: monitoring of respiratory and heart function by the biotechnical. The depth of narcosis (twitching/movement) can additionally be observed by the researcher performing the surgery.

5. Scoring of the animals daily after surgery  
6. Euthanasia according to one of the methods listed in Appendix IV of directive 2010/63/EU.  
7. Pain medication, starting before surgery, and continued for two days standard. If there is any indication, pain medication will be continued beyond this period.

#### 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.

- The rats will be euthanized in case one or more of the following humane endpoints are observed:
  - Weight loss (criteria determined in consultation with the veterinarian)
  - Severe lethargy
  - Severe tachycardia
  - Severe tremor
- Possible other signs of sepsis
- Loss of the animals' ability to walk and feed themselves
- Unexpected wound complications (such as non-closing and severe pus formation)
  
- The rabbits will be euthanized in case one or more of the following humane endpoints are observed:
  - Weight loss (criteria determined in consultation with the designated veterinarian)
  - Severe lethargy
  - Severe tachycardia
  - Severe tremor
  - Possible other signs of sepsis
  - Loss of the animals' ability fo walk and feed themselves
  - Joint infection with severe pus formation.

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

Rats: unlikely, max. 10%. The chance is higher in the pilot study, max. 20%.

Rabbits: very unlikely, max. 5%.

#### K. Classificatie van ongerief

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

The procedure is classified as moderate.

### 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.

The animals need to be euthanized to harvest the bone and implant for bacterial culture.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Spinal fusion in rats and rabbits in combination with ectopic implants"/> |

*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.

We have previously identified inflammation-associated cytokines and bacterial-derived factors that could serve as bone-stimulating coatings on ceramics or metals intended for various orthopedic applications [1,2,3]. We more recently also showed that the use of components derived from bacteria is potentially a safe and effective way to stimulate bone formation (unpublished). These biological factors enhance bone formation by causing a beneficial immune response.

Currently, the transplantation of patient's own bone is used to stimulate bone formation in patient's when needed, including non-healing fractures, filling of large bone defects, or the re-alignment of the skeleton [4]. There are however a lot of complications associated with the bone harvesting procedure and there

is only a limited amount of bone available for the surgeon. The coating of materials with the aforementioned biological factors could be an alternative way to stimulate de novo bone formation or to improve the bone integration of implants. The fusion of vertebrae- e.g. during abnormal curvature of the spine or due to chronic back pain- is the most important application for which bone grafts are needed [6].

We aim to test the efficacy of our coatings on the bone formation in a spinal fusion model in rats and rabbits [7, 8]. As spinal fusion is the most important application for which bone grafts are used, we would like to test the efficacy of our coatings in the same setting. A calcium phosphate ceramic will be used (e.g. biphasic calcium phosphate BCP or tricalcium phosphate TCP). These materials are promising for use in spinal fusion because of their ability to conduct bone formation along their surface. If bone-stimulating coatings are identified in the spinal fusion model, these can directly be tested for their ability to improve bone integration in the implant infection models.

The spinal fusion procedure is relatively simple to perform in these animals, in contrast to the spinal fusion technique in humans or larger animal models, where instrumentation is required. The rat spinal fusion model allows for better study of the underlying processes as there are more research tools available for rodents compared to rabbits and larger animals. The rabbit model on the other hand allows for better translation to the clinic, as larger constructs can be tested and the immune system is more comparable to humans. When using inflammation-associated cytokines or components derived from bacteria, the immune response is an important outcome parameter. We believe that this is more representative of the human situation in rabbits than it is in rats. Furthermore, in rabbits, a comparison can be made between our coating method and the current gold standard in the clinic (e.g. autologous bone harvested from the hip bone). This is difficult to perform in rats due to their smaller size.

The implantation of ectopic constructs in the same animals allows for additional studies to be performed in parallel to the functional spinal fusion test in the orthotopic location.

First, in an ectopic location, bone formation is only the result of osteoinduction (i.e. differentiation of stem cells into bone cells), whereas osteoconduction (i.e. bone outgrowth from existing bone) also plays a role in the orthotopic location. By combining the ectopic and orthotopic sites, the potential of the inflammatory compounds for osteoinduction and osteoconduction can be both studied. This can elucidate the potential use of the compounds in different applications and locations.

Second, the optimal dose of in vitro-identified inflammatory compounds can be studied in an ectopic location before testing them in an orthotopic location. Because there are more implantations possible in the ectopic site compared to the orthotopic site, we can also try to identify new bone-stimulating inflammatory compounds in the ectopic location which can be tested in follow-up studies. For the first in vivo studies, the optimal dose of interesting inflammatory compounds have already been determined ectopically in a previous study and can be directly tested in an orthotopic location. By combining the ectopic and orthotopic locations, the animals are used in an optimal way and multiple research questions can be answered within the same study.

Several outcome parameters will be studied related to new bone formation and inflammation. In vivo micro-CT scans are performed under general anesthesia to quantify new bone formation at different time points. Fluorochrome markers are injected at different time points to trace the onset and progression of bone formation. After euthanization of the animals, local inflammation markers are measured on tissue samples. For the ectopic implants, quantification of the bone staining in histological samples is performed. For the spinal fusion implants, a combination of different methods is used to assess the degree of fusion between the vertebrae, including manual palpation, ex vivo micro-CT imaging, and quantification of the bone tissue in histological samples. In the rabbit studies, the systemic effects of the coatings will also be assessed by measuring systemic markers of inflammation on blood samples. Local inflammation markers are also measured on the spinal fusion masses.

## References:

1. M Croes, F. Cumhur Oner, Moyo C. Kruyt, Taco J. Blokhuis, Okan Bastian, Wouter J.A. Dhert, Jacqueline Alblas. Proinflammatory Mediators Enhance the Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells after Lineage Commitment. Plos one 2015.
2. M Croes, W Boot, B Pouran, MC Kruyt, D Gawlitta, Y van der Helm, C Vogely, H Weinans, J Alblas, WJA Dhert, FC Oner. Bacterial infection increases bone volume in a rabbit osteomyelitis model. 2015. Submitted
3. M Croes, W Boot, MC Kruyt, WJA Dhert, B Pouran, FC Oner, J Alblas. Bacteria-associated inflammation induces bone formation in a pre-clinical rabbit model. In preparation
4. PV Giannoudis, H Dinopoulos, E Tsiridis : Bone substitutes: An update. Injury 2005.
5. BM Desai. Osteobiologics. Am J Orthop 2007
6. WG De Long, TA Einhorn, K Koval et al. Current concepts review: Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. J Bone Joint Surg AM 2007
7. SD Boden, GJ Martin, M Morone, JL Ugbo, L Titus, WC Hutton. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. Spine. 1999;24:320–327
8. Drespe et al. Animal models for spinal fusion. Spine J. 2005.

---

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.

---

## Surgical procedures

Ectopic implantations: Using a single skin midline incision in the dorsum, PMMA (poly methyl methacrylate) discs are implanted intramuscularly and subcutaneously. We have previously used up to 18 samples in rabbits and up to 14 samples in rats, leaving enough space between the samples to minimize cross-over effects between samples. After 6 weeks, all PMMA discs are removed from their surrounding membranes ('biomembranes'), and replaced scaffolds (calcium phosphate ceramics or porous metal implant) coated with the factors of interest. These 'biomembranes' act as a physical barrier, preventing initial leakage of growth factors or inflammation-associated factors to the surrounding tissues [1]. As a result, one creates a more localized inflammatory response and limits the cross-over effects to neighbouring implants. The first procedure (implantation of the spacer) is expected to take approximately 1 hour, while the second procedure (implantation of the loaded material in the 'biomembrane') is thought to take approximately 1.5 hours. The implantation of the loaded constructs is always performed in a randomized way.

The membranes act as a physical barrier, preventing initial leakage of the delivered components which could affect neighbouring scaffolds. The skin wounds are closed with resorbable sutures. During the experiment, fluorochrome markers are injected subcutaneously at max. three time points to determine the progression of bone formation by fluorescence microscopy. In vivo micro-CT scans are performed under general anesthesia to quantify the progress of bone formation (max. 3 times). The animals are euthanized 8-12 weeks after the second surgery to retrieve the implants for analyses by histology. This exact end point (8-12 weeks) is chosen for each experiment separately, but is determined by the speed of bone formation which is expected (i.e. if bone stimulating growth factors such as BMPs are used), and will be minimized.

---

This model has been used by our group in both species successfully without loss of animals. In rabbits, blood is harvested from the ear vein at max. 5 time points to measure systemic markers of inflammation.

Spinal fusion: this procedure is combined with the second surgery for the ectopic implantations at week 6. The dorsal midline skin incision is followed by two paramedian fascial incisions between the multifidus and longissimus muscles until the transverse processes in the lumbar region are exposed. The exposed transverse processes are decorticated bilaterally with an electric burr. On both sides of the vertebra, the graft of interest is implanted next to the spine. This involves a calcium phosphate ceramic or a porous metal implant in the experimental group, with or without coating with the biological factor of interest. When a comparison is made with the current gold standard in the clinic (i.e. autologous bone), separate fascial incisions are used to harvest corticocancellous bone from the iliac crest bone to place between the transverse processes in the same way. The spinal fusion procedure can be performed at a single level or at two levels of the vertebrae [1,2, 3]. The skin wound is closed with resorbable sutures. The animals are euthanized (see ectopic implantations) for ex vivo micro-CT scanning and the fusion masses/ectopic implants are retrieved for histological analyses. Local inflammation markers are measured in the fusion masses.

#### Bone regeneration measurements

The primary outcome parameter is the amount of bone formation after 8-12 weeks. For the ectopic implants, quantification of the bone in histological samples is the best method. For the spinal implants, a combination of techniques is used to assess the degree of fusion between the vertebrae, including manual palpation, in vivo and ex vivo micro-CT, and quantification of the bone tissue in histological samples. Animals will receive fluorochrome markers subcutaneously to determine the onset and localization of new bone formation by fluorescence microscopy post-mortem.

#### Inflammation measurements

In the rabbits, blood will be harvested at max. 5 time points to measure systemic markers of inflammation. Local inflammation markers will be measured on tissue samples after euthanization.

#### Animal stress

The animals are estimated to experience mild stress (cumulative). The procedures are expected to take approximately 1 hour (first surgery) and 2 hours (second surgery).

#### Anaesthesia protocol

Rats: Start and maintained with isoflurane/oxygen.

Rabbits: a combination of injection analgetics/anesthetics is used. The protocols for adequate anaesthesia are developed together with the veterinarian.

#### Pain management

All animal receive injection analgetics. The protocols used for pain management will be developed together with the designated veterinarian. If any



unexpected signs on pain continue to exist in the first days after the operational procedure, as observed during daily scoring of the animals, the designated veterinarian will be consulted for the adequate pain management.

#### Antiseptic techniques

All operations will be performed aseptically conditions. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves and sterile gown. The surgeon will wear a surgery mask and cap. Only autoclaved instruments will be used. After shaving, the skin will be disinfected with Providone Iodine. All materials introduced into the animals are autoclaved or filtered to ensure sterility.

#### Postoperative care

The animals will be placed on heat blankets post-operatively. The animals will be housed per two, unless there are signs of aggression towards each other. The animals will be scored daily for one week after the operational procedure. The weight of the animals will be measured once a week. The animals will receive injection pain medication for two days at minimum, and longer if necessary.

#### Euthanasia protocols

Euthanasia is performed according to one of the methods listed in appendix IV of directive 2010/63/EU. The animals will be euthanized 8-12 weeks after the second surgery . This involves CO2 inhalation in rats, and an overdose of Pentobarbital i.v. in rabbits under the same general anaesthesia and pain medication as the surgery procedure.

#### References:

1. Viateau V, Guillemin G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res* 2007;25: 741-9
2. SD Boden, GJ Martin, M Morone, JL Ugbo, L Titus, WC Hutton. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine*. 1999;24:320-327
3. AM Riordan, R Rangarajan, JW Balts, WK Hsu, PA Anderson. Reliability of the Rabbit Postero-Lateral Spinal Fusion Model: A Meta-Analysis. *JOR* 2013
4. Drespe et al. Animal models for spinal fusion. *Spine J*. 2005.

---

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

The following section describes the minimal number of animals needed for each study. For the rabbit study, a 5% loss of animals is estimated. This percentage is based on literature. As this loss in the rabbits is mainly the result of the autologous bone harvesting procedure, it is not expected in the rat studies.

The outcome parameter on which the group size are based is the success of spinal fusion (yes or no) as determined by micro-CT. The difference of the means and the coefficient of variance of treatment with a biological coating in the spinal fusion model is unknown [1]. We can therefore only determine the minimal

group size based on a rough estimation of these parameters.

In a typical experimental design, 3 groups are used. We will perform a one way ANOVA's with a Bonferroni post-hoc correction. The alpha is adjusted according to two comparisons that are made (experimental group vs. positive control and negative control OR two experimental groups vs. positive control). For example:

- 1) Positive control group, autograft or bone morphogenetic protein (BMP)
- 2) Negative control group (e.g. calcium phosphate ceramic such as biphasic calcium phosphate BCP or tricalcium phosphate TCP)
- 3) Experimental group (e.g. calcium phosphate ceramic coated with proinflammatory cytokine or bacterial-derived factor)

Using an adjusted 'alpha' of 0.025 (0.05/2), a power of 80%, and a two-sided test, we find that 11 animals are needed per group when considering the difference of the means and a coefficient of variance of both 20%. We hereby consider a difference of the means of at least 20% to be of clinically relevance.

We expect to perform the following studies in the upcoming 5 years:

STUDY 1, the effect of inflammation-associated cytokines on bone formation in rats (33 rats):

- Group 1. Pos control, calcium phosphate with BMP, N=11
- Group 2. Neg control, empty calcium phosphate (e.g. BCP or TCP), N=11
- Group 3. Experimental group, calcium phosphate coated with proinflammatory cytokines, N=11

We have already determined the optimal concentration of a number inflammatory compounds in an ectopic location. These can be studied in the orthotopic location in study 1. Simultaneously, we can perform dose studies for bacterial components determined in vitro in the ectopic location in the same animals. These can then be tested in the orthotopic location in study 2.

STUDY 2, the effect of bacterial components on bone formation in rats (33 rats):

- Group 1. pos. control, calcium phosphate with BMP, N=11
- Group 2. Experimental group 1, calcium phosphate coated with bacterial component 1, N=11
- Group 3. Experimental group 2, calcium phosphate coated with bacterial component 2, N=11

The optimal concentration of bacterial components are determine in the ectopic location in study 1. These can be studied in the orthotopic location in study 2. Simultaneously, we can perform dose studies for future experiments in the ectopic location in study 2.

STUDY 3, the effect of inflammation-associated cytokines on bone formation and systemic inflammation markers in rabbits (35 rabbits):

- Group 1. Pos control, autologous bone, N=11
- Group 2. Neg control, empty calcium phosphate, N=11
- Group 3. Experimental group, calcium phosphate coated with inflammation-associated cytokines, N=11

For this rabbit study, we add an extra 2 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. We believe that a loss of approximately 5%,

due to deep wound infections or autologous bone harvest-associated nerve damage and blood loss, is a realistic estimation [2-6].

We have already determined the optimal concentration of a number inflammatory compounds in an ectopic location. These can be studied in the orthotopic location in study 3. Simultaneously, we can perform dose studies for bacterial components determined in vitro in the ectopic location in the same animals. Subsequently, the optimal dose can be tested in the orthotopic location in study 4.

STUDY 4, the effect of bacterial components on bone formation and systemic inflammation markers in rabbits (35 rabbits) :

Group 1. Pos control, autologous bone, N=11

Group 2. Experimental group 1, calcium phosphate coated with bacterial component 1, N=11

Group 3. Experimental group 2, calcium phosphate coated with bacterial component 2, N=11

For this rabbit study, we add an extra 2 animals to account for a possible loss of animals during the experiment. We believe that a loss of approximately 5%, due to deep wound infections or autologous bone harvest-associated nerve damage and blood loss, is a realistic estimation [2-6].

The optimal concentration of bacterial components are determine in the ectopic location in study 3. These can be studied in the orthotopic location in study 4. Simultaneously, we can perform dose studies for future experiments in the ectopic location in study 4.

Thus, we estimate that in total 66 rats and 70 rabbits are needed.

## REFERENCES

1. AM Riordan, R Rangarajan, JW Balts, WK Hsu, PA Anderson. Reliability of the Rabbit Postero-Lateral Spinal Fusion Model: A Meta-Analysis. JOR 2013
2. Bransford et al. Effect of zoledronic acid in an L6-L7 rabbit spine fusion model. Eur Spine J. 2007 Apr; 16(4): 557-562.
3. Cinotti et al. Experimental posterolateral spinal fusion with porous ceramics and mesenchymal stem cells. J Bone Joint Surg Br. 2004 Jan;86(1):135-42.
4. Lee et al. The effect of acute smoking on spinal fusion: an experimental study among rabbits. J Trauma. 2005 Aug;59(2):402-8.
5. Lehman et al. The effect of alendronate sodium on spinal fusion: a rabbit model. Spine J. 2004 Jan-Feb;4(1):36-43
6. Long et al. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on spinal fusion. J Bone Joint Surg Am. 2002 Oct;84-A(10):1763-8.

---

## B. De dieren

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

We would like to use both rats and rabbits for our experiments. There are more research tools (e.g. antibodies) available for the rat species, allowing for more mechanistic studies. The rabbits on the other hand allow for more translational research: safety studies can be performed due to their comparable immune system to humans, a comparison can be made between our coating and the golden standard (i.e. autologous bone grafting) and larger constructs can be tested in rabbits

Rats: male Fischer 344, 10-16 weeks (Charles River). We estimate to use 66 rats (see Statistical Methods).

The Fischer 344 rat has been used as a spinal fusion model before [1]. Our ectopic rat model also makes use of this male rat strain, which allows for comparison of the data when using calcium phosphates or BMP-2. Furthermore, in this model we can make a good prediction of the amount of bone formation in the control group, which allows us to select the appropriate timepoints for analyses. The estrogen levels in female rats can fluctuate due to stress and age [2], and can affect bone regeneration [3,4]. Furthermore, it has been shown that male and female rats show a difference in their bone metabolism [5,6]. If male and female rats are studied in a mixed population, this will cause a strong increase in the observed variance. We therefore prefer to use male rats only. As an advantage, we have experienced that the male Fischer 344 rats can be housed together without problems [5,6]

Rabbits: adult female New Zealand White, 20-24 weeks (Charles River). We estimate to use 70 rabbits (see Statistical Methods).

The rabbit spinal fusion model has been used frequently, as the fusion rate with autologous bone is similar to humans. A number of characteristics of the rabbits (age, weight, gender, species) have been tested on the rate of fusion in a meta-analysis study [7]. This study shows that the use of female New Zealand white rabbits is very suitable. For our research this is beneficial, as we previously studied the biological coating components in female New Zealand white rabbits too. However, we wish to keep the sex within our spinal fusion model fixed, due to the 20% difference in the fusion rate between male and female rabbits [7]. The increase in variance when using a mixed-gender population would result in a need for a larger sample size to demonstrate a statistically significant difference. Individual housing of male rabbits is associated with a decreased general well-being, therefore the use of females may be preferable. There is no evidence that fluctuating estrogen levels in female rabbits can affect the bone formation process [8]. In addition, the rabbit tibia model also makes use of female rabbits, therefore allowing better translation to the spinal fusion model. This meta-analysis furthermore shows that the animals should be at least 3 kg in weight, while there seems to be less of an effect for the age of the animals. Our choice of the age/weight allows for a sufficient number of ectopic implants in the dorsal region, with enough space between them to minimal cross-over effects between the samples.

Adult rabbits are used as this seems to be beneficial for the success of fusion. Furthermore, almost all studies described in literature make use of adult rabbits [7].

Generally speaking, the rabbit model is used in a final step before an instrumented spinal fusion model (e.g. sheep or goats). As such, larger constructs can be used and the rabbit immune system allows for prediction of dose effects considering that its immune system is more comparable to humans than rodents [9, 10]. This is an important aspect to consider, as some of the biological coatings induce bone formation through an immune response.

#### References:

1. Lopez et al. Acceleration of Spinal Fusion Using Syngeneic and Allogeneic Adult Adipose Derived Stem Cells in a Rat Model. *J Orthop Res* 2009.
2. Arakawa K, Arakawa H, Hueston CM, Deak T. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on central expression of interleukin-1 evoked by stress in female rats. *Neuroendocrinology*. 2014;100(2-3):162-77. PubMed PMID: 25300872.
3. Hong L, Sultana H, Paulius K, Zhang G. Steroid regulation of proliferation and Biochem Mol Biol. 2009 Apr;114(3-5):180-5. PubMed PMID: 19429449. Pubmed Central PMCID: 2682591.
4. Calis M, Demirtas TT, Atilla P, Tatar I, Ersoy O, Irmak G, et al. Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue-engineering study. *Plastic and reconstructive surgery*. 2014 Apr;133(4):499e-510e. PubMed PMID: 24675202.
5. Sample SJ, Racette MA, Hao Z, Thomas CF, Behan M, Muir P. Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. *PloS one*. 2012;7(9):e43215. PubMed PMID: 22984413. Pubmed Central PMCID: 3439425.
6. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, Perka C, Duda GN, Kasper G. Sex-specific compromised bone healing in female rats might

be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. Bone. 2009 Dec;45(6):1065-72

7. AM Riordan, R Rangarajan, JW Balts, WK Hsu, PA Anderson. Reliability of the Rabbit Postero-Lateral Spinal Fusion Model: A Meta-Analysis. JOR 2013

8. Mapara M, Thomas BS, Bhat KM/ Rabbit as an animal model for experimental research. Dent Res J (Isfahan). 2012 Jan-Mar; 9(1): 111-118

9. Copeland S, Warren HS, Lowry, SF, Calvano SE, Remick D. Acute Inflammatory Response to Endotoxin in Mice and Humans. Clin Diagn Lab Immunol. 2005 Jan; 12(1): 60-67

10. Jacquier V, Estellé, Schmaltz-Panneau B et al. Genome-wide immunity studies in the rabbit: transcriptome variations in peripheral blood mononuclear cells after in vitro stimulation by LPS or PMA-Ionomycin. BMC Genomics 2015, 16:26

---

### 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.

#### Replacement

The biological coatings we would like to test are thought to stimulate bone formation due to their immunogenic properties.

The complexity of the bone environment and the interaction between immune and bone cells are difficult to mimic in vitro. Although we and others try to predict their effects on bone cells in vitro [1], their actual effects on bone tissue in vivo effects seem to be very different [3,4]. However, in vitro studies are still performed where possible, for instance to determine the optimal coating methods for the in vivo studies. For this purpose, the differentiation of stem cells into bone cells can be tested on the different coated constructs in vitro.

#### Reduction

Although the spinal fusion model requires relatively large group sizes to demonstrate statistically significant differences, there are a number of ways by which the number of rabbits can be reduced.

First, ectopic implantations can be performed in parallel so that multiple research questions can be answered within one experiment. The ectopic screening model allows for a large number of implants to be studied. We have previously used up to 18 samples in rabbits. Furthermore, the subcutaneous and

intramuscular locations can be easily studied in parallel.

Second, mechanistic studies are first performed in a screening setting ectopically. As the spinal fusion requires large group sizes, only the optimal conditions will be tested here. As such, 2-3 groups in total are sufficient.

Third, spinal fusion at two vertebral levels means that 2 treatments can be compared to the control in the same study.

#### Refinement

- Skin wounds will be sutured intracutaneously, using resorbable sutures
- Animals are housed together as much as possible
- Food is given ad libitum (pellets and hay)
- Animals are weighed weekly to monitor health
- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes during surgery
- During and after surgery the animals will be placed on heat blankets
- Animals will receive adequate anaesthetics to prevent harm during surgery
- Analgesia medication will be administered until 2 days after surgery to prevent harm post-operatively
- Daily scoring of the animals after the operations. Pain medication will be continued if necessary. For rabbits, this is a standard procedure after the OR

#### References:

1. Mo et al. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. BMC Cell biology. 2008.
2. Croes et al. Proinflammatory Mediators Enhance the Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells after Lineage Commitment. Plos One. 2015.
3. Croes et al. Local inflammation and bone formation in a new translational animal model. In preparation.
4. Croes et al. Bacterial infection increases bone volume in a rabbit osteomyelitis model. Submitted.

---

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.

The animals will have at least 1 week to acclimatize to the new environment before surgery. Animals will be given food and water ad libitum. The rabbits will be monitored for the respiratory and heart function by the designated biotechnician. The animals will be placed on heat blankets postoperatively. The animals will be returned to routine housing after they have recovered from anesthesia. For specific information see 'refinement'.

The animals will be housed conform the standards of the GDL Utrecht. They will be housed in groups of two as much as possible. This has been done for female New Zealand White rabbits and male Fischer rats in the past, usually without problems. In cases when animals show signs of aggression towards each other, the animals will be housed individually to prevent harm.

The animals are weighed weekly by the animal care takers or researcher and monitored weekly (written and signed off in the working plan). This observation frequency is higher (once daily) after the surgeries. When weight loss is suspected later in the experiment, the animals will be monitored for the humane

endpoints and weighed daily.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Cumulative moderate (matig) stress is estimated based on the following procedures:

-Operations: moderate stress. Due to anesthetics and ectopic implantation of samples and implantation next to the spinal column. Animals may experience pain in the dorsum after the operation. When autologous bone is used, the animals may experience pain in the hip bone from bone harvesting. Animals will have reduced food intake and have weight loss due to the operations.

-Daily scoring of animals after the operation: mild stress due to handling.

-Injection of pain medication subcutaneously: mild stress due to handling and injection.

-Injection of fluorochrome markers subcutaneously (max. 3 times depending on duration of experiment): moderate stress caused by handling and local irritation of the skin (procedure causes mild stress, but considered as moderate as it is repeated).

-In vivo micro-CT scans (max.3 times depending on duration of experiment): moderate moderate stress due to handling and anesthetic induction (procedure causes mild stress, but is considered as moderate as it is repeated)

-Blood harvest (rabbits, max. 5 times depending on studied factor and duration of experiment): moderate due to handling and ear irritation (procedure causes mild stress, but it is considered as moderate as it is repeated).

Euthanasia: mild stress due to handling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

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

1. At least 1 week to acclimatize to the new environment before surgery
2. Adequate use of injection anesthetics during the implantation procedure
3. The depth of narcosis (twitching/movement) can also be observed by the researcher performing the procedure. In the case of rabbits, the respiratory and heart function will be monitored by the biotechnician assisting with the anesthetics during the OR.
4. Adequate observation of vital signs of the animals post-operatively. Scoring of the animals daily after operations by the animal caretakers and the researcher.
5. For euthanasia, one of the methods listed in Appendix IV of directive 2010/63/EU is used
6. Pain medication, starting before the operation, and continued for two days as standard. If there is an indication, pain medication will be extended.

### **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.



- The animals will be euthanized in case one or more of the following humane endpoints are observed:
- Weight loss. When weight loss is suspected (reduced food intake), the animals will be weighed daily to monitor welfare
- Severe lethargy
- Severe tachycardia
- Severe tremor
- Loss of the animals' ability to walk and feed themselves
- Persistent infection of wounds.
- 

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

Rats: not expected.

Rabbits: very unlikely, max. 5%.

#### **K. Classificatie van ongerief**

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

The procedure is classified as moderate (matig).

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

The animals need to be euthanized to harvest the implants (ectopic model) for histology.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct/min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016445

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 7 april 2016  
Betreft **Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven**  
Geachte [REDACTED]

Op 23 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Smart coatings for orthopedic implants" met aanvraagnummer AVD115002016445. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 23 maart 2016 hebben wij u een vraag gesteld over het aantal dieren dat u beschrijft in de bijlagen dierproeven. De aantallen waren niet consistent weergegeven. U heeft de bijlagen dierproeven aangepast en deze op 29 maart 2016 naar ons toegestuurd.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "Smart coatings for orthopedic implants" starten. De vergunning wordt afgegeven van 7 april 2016 tot en met 1 januari 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Aanvullend stelt de CCD twee algemene voorwaarden om te voldoen aan datgene wat voort komt uit artikel 10a. van de wet.

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 18 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij nemen het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. In aanvulling hierop worden de twee algemene voorwaarden gesteld die aan meerjarige projecten worden verbonden.

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 gegevens in de rechter kantlijn in deze brief.

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

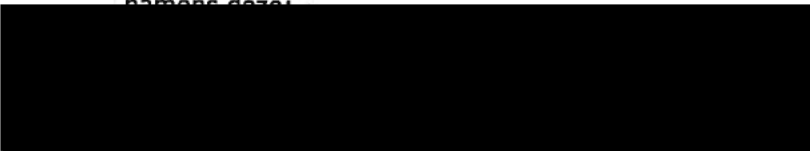
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:

  
ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

**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 woonplaats: 3501 AA Utrecht  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 april 2016 tot en met 1 januari 2021, voor het project "Smart coatings for orthopedic implants" met aanvraagnummer AVD115002016445, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD Onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Onderzoekster [REDACTED] verantwoordelijk:

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 februari 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 29 maart 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 23 februari 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 18 februari 2016, ontvangen op 23 februari 2016
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag zoals ontvangen op 29 maart 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Implant infection model in rats and rabbits	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Sprague Dawley	294	Matig
Implant infection model in rats and rabbits	Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) / new sealand white	176	Matig
Spinal fusion in rats and rabbits in combination with ectopic implants	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / fisher 344	66	Matig
Spinal fusion in rats and rabbits in combination with ectopic implants	Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) / new zealand white	70	Matig

### Algemene voorwaarden

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

- 1) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen met instemming van de IvD.
- 2) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of

**Datum**  
7 april 2016

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016445

omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

**Datum**  
7 april 2016

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016445

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

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

**Datum**  
7 april 2016

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016445

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

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

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

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

[Redacted]

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 19 april 2016 16:09  
**Aan:** [Redacted]  
**Onderwerp:** terugkoppeling besluit aanvraag AVD115002016445

Geachte leden van DEC Utrecht,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waarover uw Dec advies heeft uitgebracht. Het betreft het project " Slimme coatings voor orthopedische implantaten" met aanvraag nummer AVD115002016445, uw interne code 2015.II.548.037. Op basis van uw advies heeft de CCD besloten de aanvraag te vergunnen, aan de vergunning zijn twee algemene voorwaarden verbonden om te voldoen aan datgene wat voortkomt uit artikel 10a van de wet. De aanvrager is van het besluit op de hoogte gesteld.

De CCD dankt u voor het uitbrengen van uw advies,

Met vriendelijke groet, [Redacted]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)



Inventaris Wob-verzoek W16-13S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016447</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 en 2			x				x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Mail nieuwe NTS 4-4-2016				x		x	x	
8	Niet-technische samenvatting herzien	x							
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	
11	Mail terugkoppeling DEC 19-4-2016				x		x	x	

26 FEB, 2016



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 1447 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Geert Grootplein 10
		Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]
		Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
		IBAN	NL90ABNA0231209983
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(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	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |            |  |
|-----------------------------|------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input 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 | 2 4 _ 0 3 _ 2 0 1 6 |
| Einddatum  | 2 4 _ 0 3 _ 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Een verlamd afweersysteem in ernstig zieke patiënten; bijdragende factoren en behande
- 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 € 1.187,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

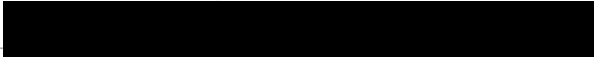
## 6 Ondertekening

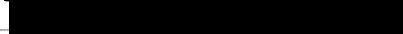
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

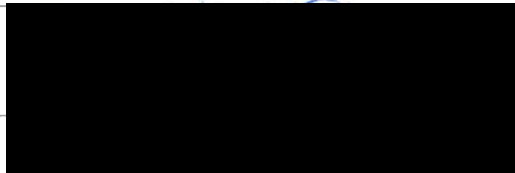
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 24 - 02 - 2016

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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	The contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis

## 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 or 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 <input type="checkbox"/> Higher education or training
-----	---	--

---

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

#### **The burden of septic shock at the Intensive Care and the role of immunoparalysis**

With an incidence of over 20 million patients a year worldwide, sepsis is a major health care burden (1). Septic shock is defined by a fluid refractory shock state with a mortality up to 30%, and its incidence is increasing (2-4). The release of pro-inflammatory mediators in sepsis results in the loss of peripheral vascular resistance, resulting in hemodynamic instability and end-organ failure (5, 6). Often vasopressor therapy is necessary to improve hemodynamic parameters, of which, noradrenaline is the primary agent of choice since the birth of modern day critical care in the 1950's (7). Previous strategies have aimed to treat sepsis by targeting pro-inflammatory mediators. However, most of these approaches have failed (6, 8-10). This is probably due to the fact that the majority of sepsis patients do not succumb to the initial pro-inflammatory "hit", but die at a later time-point in a pronounced immunosuppressive state that renders them unable to clear their primary infection and extremely vulnerable towards secondary infections (5, 6, 11-23). Traditionally, the immune response in sepsis was envisioned as a biphasic sequelae of events, namely a hyperinflammatory reaction followed by a compensatory anti-inflammatory reaction. However, there is increasing evidence that immunoparalytic mechanisms exist from the onset of sepsis (14, 19, 24, 25). As such, immunoparalysis is increasingly being recognized as the overriding immune dysfunction during sepsis (22, 23).

Many mechanisms are implicated in sepsis-induced immunoparalysis, including impaired pro-inflammatory (e.g. TNF- $\alpha$  and IL-6) and enhanced anti-inflammatory (e.g. IL-10) cytokine production, reduced antigen presenting capacity and phagocytic functions, depletion of several immune cells by apoptosis, inhibition of T cell function by negative signalling pathways, and increased numbers of suppressive immune cell subpopulations such as regulatory T cells (5, 6, 8, 10-18, 26-34). Moreover, several signs of immunoparalysis, namely downregulation of mHLA-DR on monocytes, attenuated *ex vivo* TNF- $\alpha$  production by stimulated monocytes, and increased expression of Programmed-Death-1 on T cells, have been associated with increased mortality in sepsis (21, 35). Novel therapeutic targets and strategies, including PD-L1, CTLA-4, IFN- $\gamma$ , GM-CSF and IL-7 (36-40) are currently under investigation. However, we hypothesize that our current management patients with septic shock, specifically the use of noradrenaline, importantly contributes to sepsis-induced immunoparalysis.

#### **Noradrenaline and immunoparalysis**

As mentioned earlier, the catecholamine noradrenaline is the cornerstone treatment for septic shock in the ICU, virtually all patients with septic shock are treated with this compound (41). Noradrenaline signals via alpha ( $\alpha$ 1-2) and beta ( $\beta$  1-3) adrenergic receptors (adrenoceptors). Interestingly, catecholamines exert profound immunosuppressive effects, but these have mainly been investigated for adrenaline. Adrenaline was shown to potently inhibit LPS-induced production of TNF- $\alpha$ , and enhance production of anti-inflammatory IL-10 *in vitro* as well as in animal and human models of inflammation (42-44). These effects were shown to be dependent on the  $\beta$ -adrenergic receptor, as they were abolished by use of  $\beta$ -blockers (45). Furthermore, we have recently shown that endogenously increased production of adrenaline in humans potently dampens the inflammatory response, again through increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (46). The effects of noradrenaline, a potent  $\alpha$ -adrenergic agonist which also has  $\beta$  affinity, on the immune system are far less studied, and *in vivo* data are lacking altogether. Nevertheless, *in vitro*, noradrenaline, inhibits pro-inflammatory cytokine production as potently as adrenaline, and effects were shown to be abolished by  $\beta$ -blockers (44, 47, 48) Therefore, treatment with noradrenaline may importantly contribute to sepsis-induced immunoparalysis.

### **Alternative vasopressors**

There are viable vasopressor alternatives for hemodynamic support in septic shock patients, namely vasopressin (49) and phenylephrine (50, 51), which are both non-catecholaminergic agents. Vasopressin acts on V1 and V2 receptors, while phenylephrine is a selective  $\alpha$ -adrenergic receptor agonist. No immunosuppressive effects have been associated with these receptors. Therefore, these vasopressors could pose a non- (or less) immunosuppressive alternative to noradrenaline, and thus prevent or alleviate sepsis-induced immunoparalysis. However, data on immunologic effects of these vasopressors is not available.

### **Synthesis**

Taken together, immunoparalysis plays an important role in morbidity and mortality in critically ill patients. As outlined above, noradrenaline may importantly contribute to immunoparalysis and alternative vasopressors may be superior in this respect. However, *in vivo* data are lacking. This project will provide these data. Identifying the differences in putative immunomodulatory effects of noradrenaline and alternative vasopressors, and their relative contribution to sepsis-induced immunoparalysis will ultimately contribute to optimization of hemodynamic management in septic patients.

### **References**

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*. 2001;29(7):1303-10.
2. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(12):862-74.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine*. 2003;348(16):1546-54.
4. Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest*. 2011;140(5):1223-31.
5. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*. 2013;369(9):840-51.
6. Angus DC. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *Jama*. 2011;306(23):2614-5.
7. Weil MH, Tang W. From intensive care to critical care medicine: a historical perspective. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(11):1451-3.
8. Carlet J, Cohen J, Calandra T, Opal SM, Masur H. Sepsis: time to reconsider the concept. *Critical care medicine*. 2008;36(3):964-6.

9. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *Jama*. 2013;309(11):1154-62.
10. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*. 1987;317(11):653-8.
11. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive care medicine*. 2006;32(8):1175-83.
12. Heidecke CD, Weighardt H, Hensler T, Bartels H, Holzmann B. [Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen*. 2000;71(2):159-65.
13. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(2):316-21.
14. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Molecular medicine*. 2008;14(1-2):64-78.
15. Schefold JC, Hasper D, Volk HD, Reinke P. Sepsis: time has come to focus on the later stages. *Medical hypotheses*. 2008;71(2):203-8.
16. Pugin J. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Foundation symposium*. 2007;280:21-7; discussion 7-36, 160-4.
17. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(2):325-37.
18. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama*. 2011;306(23):2594-605.
19. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiological reviews*. 2013;93(3):1247-88.
20. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *Jama*. 2008;300(4):413-22.
21. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohe J, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive care medicine*. 2010;36(11):1859-66.
22. Leentjens J, Kox M, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187(12):1287-93.
23. Hamers L, Kox M, Pickkers P. Sepsis-induced immunoparalysis: mechanisms, markers, and treatment options. *Minerva anesthesiologica*. 2015;81(4):426-39.
24. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *Journal of immunology*. 2006;177(3):1967-74.
25. Tamayo E, Fernandez A, Almansa R, Carrasco E, Heredia M, Lajo C, et al. Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. *European cytokine network*. 2011;22(2):82-7.
26. Nolan A, Kobayashi H, Naveed B, Kelly A, Hoshino Y, Hoshino S, et al. Differential role for CD80 and CD86 in the regulation of the innate immune response in murine polymicrobial sepsis. *PloS one*. 2009;4(8):e6600.
27. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology*. 2008;26:677-704.



28. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Critical care*. 2012;16(3):R112.
29. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010;129(4):474-81.
30. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(3):162-74.
31. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(1):327-36.
32. Kessel A, Bamberger E, Masalha M, Toubi E. The role of T regulatory cells in human sepsis. *Journal of autoimmunity*. 2009;32(3-4):211-5.
33. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *Journal of immunology*. 2001;166(11):6952-63.
34. Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, McDonough JS, Perlman H, McDunn JE, et al. Modulation of the Bcl-2 family blocks sepsis-induced depletion of dendritic cells and macrophages. *Shock*. 2009;31(4):359-66.
35. Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, et al. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Critical care*. 2011;15(2):R99.
36. Chang K, Svabek C, Vazquez-Guillamet C, Sato B, Rasche D, Wilson S, et al. Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Critical care*. 2014;18(1):R3.
37. Inoue S, Bo L, Bian J, Unsinger J, Chang K, Hotchkiss RS. Dose-dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis. *Shock*. 2011;36(1):38-44.
38. Leentjens J, Kox M, Koch RM, Preijers F, Joosten LA, van der Hoeven JG, et al. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;186(9):838-45.
39. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;180(7):640-8.
40. Shindo Y, Unsinger J, Burnham CA, Green JM, Hotchkiss RS. Interleukin-7 and anti-programmed cell death 1 antibody have differing effects to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Shock*. 2015;43(4):334-43.
41. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Critical care medicine*. 2008;36(1):296-327.
42. van der Poll T, Coyle SM, Barbosa K, Braxton CC, Lowry SF. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(3):713-9.
43. Van der Poll T, Lowry SF. Epinephrine inhibits endotoxin-induced IL-1 beta production: roles of tumor necrosis factor-alpha and IL-10. *The American journal of physiology*. 1997;273(6 Pt 2):R1885-90.
44. Bergmann M, Gornikiewicz A, Sautner T, Waldmann E, Weber T, Mittlbock M, et al. Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock*. 1999;12(6):421-7.
45. Monastra G, Secchi EF. Beta-adrenergic receptors mediate in vivo the adrenaline inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor release. *Immunology letters*. 1993;38(2):127-30.
46. Kox M, van Eijk LT, Zwaag J, van den Wildenberg J, Sweep FC, van der Hoeven JG, et al. Voluntary activation of the sympathetic nervous system and attenuation of the innate immune response in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(20):7379-84.

47. van der Poll T, Jansen J, Endert E, Sauerwein HP, van Deventer SJ. Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect Immun.* 1994;62(5):2046-50.
48. Rontgen P, Sablotzki A, Simm A, Silber RE, Czeslick E. Effect of catecholamines on intracellular cytokine synthesis in human monocytes. *Eur Cytokine Netw.* 2004;15(1):14-23.
49. Hall LG, Oyen LJ, Taner CB, Cullinane DC, Baird TK, Cha SS, et al. Fixed-dose vasopressin compared with titrated dopamine and norepinephrine as initial vasopressor therapy for septic shock. *Pharmacotherapy.* 2004;24(8):1002-12.
50. Ji MH, Yang JJ, Wu J, Li RQ, Li GM, Fan YX, et al. Experimental sepsis in pigs--effects of vasopressin on renal, hepatic, and intestinal dysfunction. *Upsala journal of medical sciences.* 2012;117(3):257-63.
51. Laviolle B, Donal E, Le Maguet P, Laine F, Bellissant E. Low doses of fludrocortisone and hydrocortisone, alone or in combination, on vascular responsiveness to phenylephrine in healthy volunteers. *British journal of clinical pharmacology.* 2013;75(2):423-30.

### 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 overall objective of this project is to identify whether noradrenaline contributes to sepsis-induced immunoparalysis in animal models that are relevant to the critically ill patient, and if the alternative vasopressors phenylephrine and/or vasopressin are superior in this respect .

First, we aim to investigate the effects of noradrenaline, vasopressin, and phenylephrine on the immune response *in vivo*. This subobjective (a below) will be studied using the LPS model, a standardized model to investigate the immune response which we have extensive experience with. After these experiments, we aim to investigate the contribution of noradrenaline to the development of immunoparalysis in primary and secondary infections (subobjective b below). Primary infection will consist of cecal ligation and puncture (CLP, the gold standard model of sepsis) (1). Secondary infection consists of *Pseudomonas Aeruginosa* infection (one of the most prevalent causative organism of secondary pneumonia in sepsis patients) (1, 2). Finally, we want to evaluate whether vasopressin and/or phenylephrine do not, or to a lesser extent, contribute to immunoparalysis in primary and secondary infections.

The subobjectives of this project are:

- a. To investigate the putative immunosuppressive effects of noradrenaline, and compare these to vasopressin and phenylephrine.
- b. To investigate whether noradrenaline contributes to the development of sepsis-induced immunoparalysis in primary and secondary infections.
- c. To explore vasopressin and/or phenylephrine as alternative vasopressors to prevent or limit sepsis-induced immunoparalysis in primary and secondary infections.

We think that these objectives are certainly attainable within 5 years.

### Structure and cooperation

This project is embedded in a long-standing translational research program on the modulation of the host response in infectious diseases. Our research group has more than 10 years of experience with immunological animal studies, and we are uniquely situated to translate our results

obtained in animal experiments to humans *in vivo*, both in healthy volunteers (for instance in the experimental human endotoxemia model, which is only operational in a few centres worldwide) and in critically ill patients. Also in this project, our goal is to translate the findings obtained in animals first to healthy volunteers and ultimately to patients with septic shock. Our research is published in international peer-reviewed journals, and ample external funding has been obtained to conduct this research ( [REDACTED], [REDACTED]).

Our laboratory is well equipped, including a close cooperation with the [REDACTED], [REDACTED] which the project leader headed for several years before moving to his present position.

We have a long and fruitful collaboration with the [REDACTED]. They have a world-renowned track record regarding inflammation research. Further local collaborations include the [REDACTED].

(Inter)nationally, we work together with several research groups on the topics of sepsis-induced immunoparalysis: [REDACTED]

[REDACTED] We believe the aims of this project are feasible within 5 years, as we have already performed similar studies and make use of well-described models that are operational at our institute (LPS model, placement of micro-osmotic pumps) or at the laboratories of our collaborators (CLP model and Pseudomonas model).

## References

1. de Haan JJ, Pastille E, Wirsdorfer F, Lubbers T, Greve JW, Zhang Y, et al. Lipid-rich enteral nutrition improves the defense against an opportunistic infection during polymicrobial sepsis. *Shock*. 2014;41(2):109-14.
2. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011;139(4):909-19.

### 3.3 Relevance

---

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

#### Scientific relevance

The results of this project will further progress our insights into the causes and mechanisms of sepsis-induced immunoparalysis in critically ill patients. More specifically, we will investigate whether noradrenaline, by far the most used vasopressor in septic shock, importantly contributes to sepsis-induced immunoparalysis, and provide the first evidence for superior effects of alternative treatments for these patients. In a broader sense, this project will provide increased knowledge of basic immunological mechanisms, most significantly the adrenergic system, which are applicable to other immune system-related diseases than solely those encountered in critically ill patients.

#### Social relevance

There are currently no specific markers available that can be used in routine clinical practice to identify patients with immunoparalysis. Therefore, epidemiologic data on the number of patients suffering from immunoparalysis is lacking. However, the fatalities that can be attributed immunoparalysis for sepsis patients alone can be estimated. The mortality of sepsis is approximately 30%(1). Of these fatal cases, 75% dies after 4 days, thus in a later stage of the disease which was shown to be closely related to immunoparalysis(2). As the worldwide incidence of sepsis is

estimated conservatively at 20 million per year(3), this accounts to approximately 4 million patients per year. Furthermore, in the USA alone, sepsis-associated healthcare costs add up to 25 billion US dollars(4). This indicates that identification of contributing factors and underlying mechanisms of sepsis-induced immunoparalysis, and assessment of our current approach to sepsis is highly relevant and warranted.

## References

1. Jawad I, Luksic I, Rafnsson SB. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *Journal of global health*. 2012;2(1):010404.
2. Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, Hotchkiss R, Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Current opinion in immunology*. 2013;25(4):477-83.
3. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-51.
4. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med*. 2012;40(3):754-61.

---

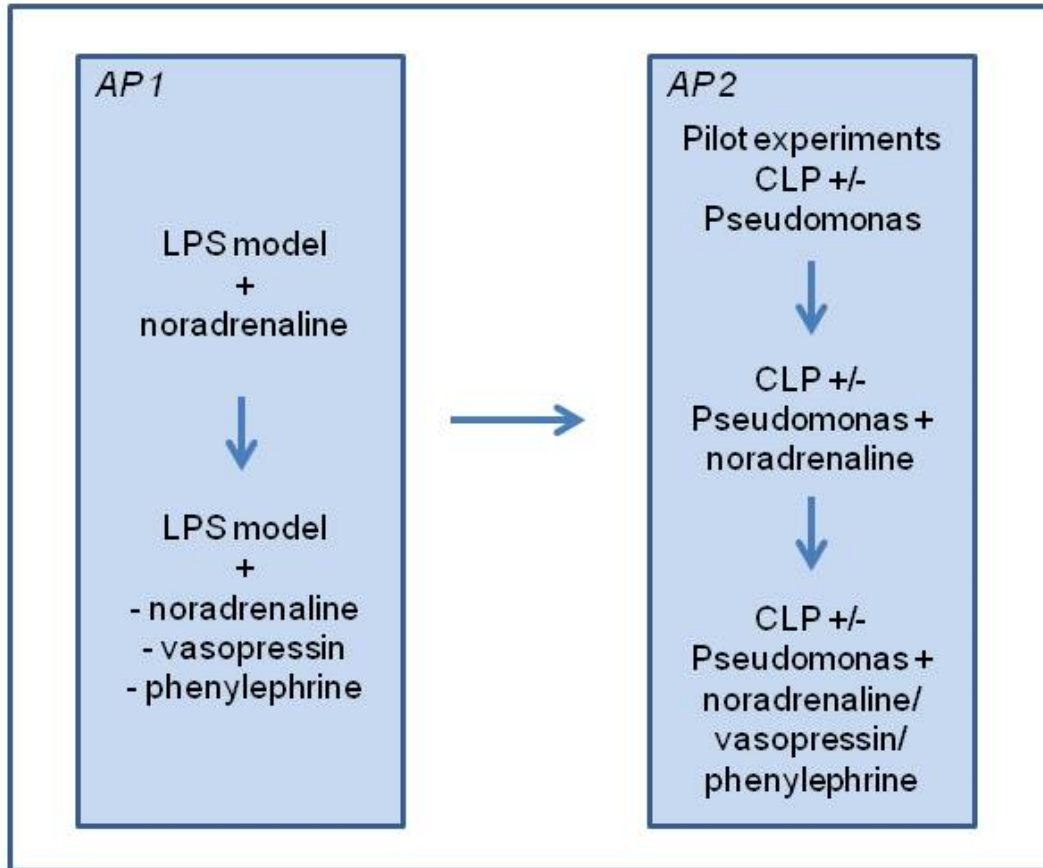
## 3.4 Research Strategy

---

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

---

The research strategy to obtain our objectives is depicted in the flowchart below, and will be further detailed in the research strategy outline (3.4.2). Coherence and global go/no-go points are described in the coherence section (3.4.3). As depicted in the flowchart, the project comprises 2 animal procedures (APs). We will start with AP 1. Information from AP1 will be used for AP2 (see 3.4.2 and 3.4.3). In AP2, we will initially perform pilot experiments with the CLP and *Pseudomonas* models as these are not yet operational in our institute. This experience can then be used for the next phases of this AP. Of note, we already have extensive experience with the LPS model, and a department at our institute we closely collaborate with (Pharmacology and Toxicology) has ample experience with micro-osmotic pumps (for continuous administration of vasopressors). The CLP and *pseudomonas* models are operational at collaborating departments.



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.

---

*Animal procedure 1: Identifying the immunosuppressive effects of noradrenaline and evaluating alternative vasopressors*

Mice will be treated with noradrenaline, vasopressin, or phenylephrine, and challenged with LPS to assess immunosuppressive effects of these vasopressor agents. Vasopressors will be delivered continuously by a micro-osmotic pump, to make it as relevant as possible to the clinical situation. Different timings of vasopressor agents relative to LPS administration will be evaluated. We have extensive experience with the LPS model and a department we closely collaborate with within our institute ( [REDACTED] ) has ample experience with micro-osmotic pumps.

*Animal procedure 2: Identifying the involvement of noradrenaline in immunoparalysis and evaluating alternative vasopressors to prevent immunoparalysis*

The contribution of noradrenaline to the development of immunoparalysis and the putative superior effects of vasopressin and/or phenylephrine will be evaluated in the CLP model, in some cases followed by *Pseudomonas Aeruginosa* infection (further described below). Mice will undergo cecal ligation and puncture (CLP, the gold standard model of sepsis)(1), in some cases followed by *Pseudomonas Aeruginosa* infection (one of the most prevalent causative organism of secondary pneumonia in sepsis patients)(1, 2). Using this approach, we can both assess effects on clearance of the primary polymicrobial infection as well as vulnerability towards secondary infections. As the CLP and CLP+*Pseudomonas* models are currently not operational in our institute, we will set up these models. For CLP, we will use a model in which mice are sacrificed at day 4 based on work from a collaborating group in [REDACTED]. We do not expect difficulties, as this model is used by numerous research groups around the world, also by two we collaborate with ( [REDACTED] ). For the CLP+*Pseudomonas* model, we will infect mice with *P. Aeruginosa* 4 days after CLP and sacrifice mice 24 hours after infection, also based on work from a collaborating group in [REDACTED].

**References**

1. [REDACTED]
2. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011;139(4):909-19.
3. Chang KC, Burnham CA, Compton SM, Rasche DP, Mazuski R, Smedonough J, et al. Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit Care*. 2013;17(3):R85.
4. [REDACTED]

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

---

For a schematic overview of the coherence between the different animal procedures and sequence of events within animal procedures, see the flowchart in the research strategy (3.4.1).

Our planned experiments are clearly aimed at assessing the contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis and evaluating the effects of viable alternative vasopressors. The two APs will be conducted subsequently as AP1 will show which alternative vasopressor exerts the least immunosuppressive effects. If both alternative vasopressors show equally less immunosuppressive effects, both will be used in AP2. The arrows in the flowchart indicate the global go/no-go points (either between or within APs), which are further detailed below. A more detailed flowchart with the go/no-go points within APs is provided in the AP appendices.

### **Global go/no-go points**

If we do not find that noradrenaline exerts immunosuppressive effects, the experiments with vasopressin and phenylephrine will not be performed. If we demonstrate that vasopressin and/or phenylephrine have less or no immunosuppressive effects compared with noradrenaline in the LPS model (AP1), there is no need to move on to AP2. If, for whatever reason, we are not able to set up the CLP and the CLP+Pseudomonas models in AP2, we will not move on to the experiments in which the contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis is evaluated. Finally, if we find that noradrenaline plays no or only a very minor role in immunoparalysis using the CLP or CLP+Pseudomonas models, we will not move on to testing alternative vasopressors in those respective models.

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	LPS model for immunosuppression
2	CLP model for immunoparalysis

**Format****Niet-technische samenvatting**

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

## 1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	De bijdrage van noradrenaline aan verlamming van het afweersysteem bij bloedvergiftiging.
1.2	Looptijd van het project	24-3-2016 - 24-3-2021
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	bloedvergiftiging, ontsteking, infectie, afweersysteem

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven



### 3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Patiënten met ernstige infecties (bloedvergiftiging genoemd) op de Intensive Care knappen vaak slecht op of krijgen zelfs nieuwe infecties bovenop de al bestaande infectie. Dit leidt tot hoge sterfte onder deze patiënten. Dit komt omdat bij deze patiënten het afweersysteem niet goed meer werkt, en daardoor de bestaande of nieuwe infecties niet goed kan bestrijden. Vrijwel alle patiënten met bloedvergiftiging krijgen een medicijn toegediend om hun bloeddruk op peil te houden. Dit middel heet noradrenaline. Er zijn aanwijzingen dat noradrenaline zorgt voor een verminderde werking van het afweersysteem. Zo zou het meest gebruikte medicijn voor de behandeling van bloedvergiftiging dus kunnen bijdragen aan het slechte herstel van diezelfde bloedvergiftiging en het krijgen van nieuwe infecties. Dit is echter nog niet onderzocht. Verder zijn er alternatieve medicijnen beschikbaar die de bloeddruk op peil kunnen houden maar waarschijnlijk geen of minder effecten hebben op het afweersysteem. Dit is echter ook nog onvoldoende duidelijk. In dit project willen we onderzoeken of noradrenaline inderdaad bijdraagt aan een slechter werkend afweersysteem bij patiënten met bloedvergiftiging en of er alternatieve medicijnen zijn die deze effecten niet hebben.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Door dit onderzoek krijgen we meer inzicht in de oorzaken van een onderdrukt afweersysteem bij ernstig zieke patiënten met bloedvergiftiging op de Intensive Care, en kunnen we alternatieve behandelingen onderzoeken om dit afweersysteem weer beter te laten functioneren. Hierdoor zullen in de toekomst patiënten beter in staat zijn infecties te bestrijden en nieuwe infecties te voorkomen. Uiteindelijk zal dit ervoor zorgen dat er minder mensen dood gaan aan infecties.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Muizen, 2256.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Het ongerief zal voornamelijk bestaan uit de ontsteking en afweerreactie die wordt veroorzaakt door het toedienen van een stof of ziekteverwekker. Verder zullen sommige dieren een operatie moeten ondergaan voor het aanbrengen van een infuus. Dit zal echter onder algehele verdoving gebeuren om het ongerief te beperken.

3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Over het gehele project zullen de muizen verschillend scoren op ongerief: Terminaal: 0% Mild: 0% Matig: 65% Ernstig: 35% 35% van de muizen zal ernstig ongerief ondervinden, omdat er gebruik gemaakt wordt van een diermodellen van ernstige infecties. Dit is onvermijdelijk omdat we willen onderzoeken of noradrenaline bijdraagt aan een minder goed werkend afweersysteem bij bloedvergiftiging. Bloedvergiftiging is per definitie een ernstige infectie, waardoor de diermodellen hiervoor ook tot ernstig ongerief leiden.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren zullen aan het eind van het experiment worden gedood.

## 4 Drie V's

4.1	<b>Vervanging</b> Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	De ontwikkeling van een afweerreactie is een complex proces, waarin verschillende cellen en organen op elkaar reageren. Het kan zijn dat een effect op bepaalde cellen van het afweersysteem zich vertaalt naar veranderingen in andere cellen, waardoor het uiteindelijke effect van de afweerreactie verandert. Deze interacties zijn dus niet in het laboratorium of in computermodellen te onderzoeken, maar alleen in levende wezens, en de muis is de laagste diersoort waarvan het afweersysteem vergelijkbaar is met die van mensen.
4.2	<b>Vermindering</b> Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	We zullen per experiment een berekening maken waarbij het benodigd aantal muizen zo laag mogelijk wordt gehouden als wetenschappelijk verantwoord is, maar voldoende om iets zinnigs over het effect te kunnen concluderen. Bovendien zullen we in kleinere groepen muizen en met modellen die minder ongerief veroorzaken bekijken of er "muziek zit" in bepaalde mechanismen/behandelingen alvorens gebruik te maken van grotere groepen muizen of modellen met meer ongerief.

- 4.3 **Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diertype model(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- Alle handelingen worden door ervaren onderzoekers en dierverzorgers uitgevoerd, waardoor het ongerief zo laag mogelijk wordt gehouden. Wanneer mogelijk zullen we verdoving gebruiken. De conditie van de muizen wordt vaak gecontroleerd volgens een gestandaardiseerde scoringsmethode en humane eindpunten zullen gerespecteerd worden. Mocht een dier teveel lijden, dan wordt het dier uit de proef gehaald. De dieren worden samen gehuisvest waar mogelijk en er zal kooiverrijking aanwezig zijn.
- 4.4 Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.
- Buiten de punten die genoemd worden onder het kopje "verfijning" zal de volgende extra voorzorgsmaatregel worden genomen:  
Het toewijzen van dieren aan behandelingsgroepen zal zo vroeg mogelijk in de experimenten uitgevoerd worden. Het wijzigen van deze toewijzingen zal zo weinig mogelijk gebeuren. Zo wordt onnodig storen van de dieren evenals verstoring van de sociale structuren zo veel mogelijk voorkomen.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

---

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

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

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

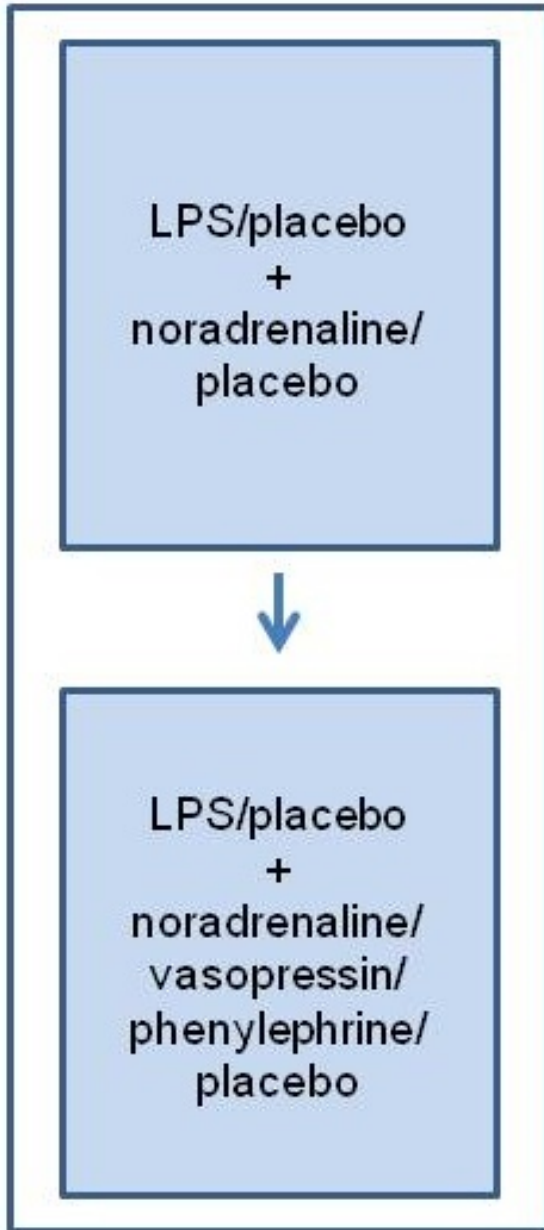
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

---

This animal procedure is aimed at investigating the effects of noradrenaline, vasopressin, and phenylephrine on the immune response *in vivo*. This will be evaluated using the LPS model, a standardized model to investigate the immune response. Vasopressors will be delivered continuously by a micro-osmotic pump, to make it as relevant as possible to the clinical situation. The vasopressors used are noradrenaline, vasopressin, and phenylephrine. Three different timings of vasopressor administration relative to LPS/placebo administration will be employed (all within 24 hours of LPS administration) to evaluate effects of long-term and short-term exposure to vasopressors. Furthermore, we will sacrifice mice at three different time-points (1.5-8 hours after LPS administration) to evaluate different cytokine profiles (some cytokines peak early, others later on). A detailed description of the procedures is provided in section A2.

We have extensive experience with the LPS model and a department we closely collaborate with within our institute [REDACTED] ) has ample experience with micro-osmotic pumps.

The flowchart of this animal procedure including the go/no-go point (indicated by an arrow) is provided below. We will start experiments to investigate the putative immunosuppressive effects of noradrenaline. If we indeed demonstrate immunosuppressive effects of noradrenaline, we will move on to the comparative experiments with all three vasopressors.



*Primary outcome parameter:*

The primary endpoint will be pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma and various tissues, to measure local and systemic inflammatory effects.

*Secondary outcome parameters:*

- Flow cytometric analysis of different cell populations obtained from blood/tissues to assess cell surface markers and functionality (the latter after *ex vivo* restimulation).
- Gene expression profiles in various tissues.
- Histology of various tissues.
- Markers of organ damage (MPO, creatinin, urea, AST, ALT etc.), measured in blood/tissues.
- Wet & dry ratios to measure capillary permeability disorders in lung.
- Blood gas analysis to assess pulmonary function.
- X-thorax to evaluate pulmonary abnormalities.
- Clinical parameters: Weight, body temperature, ruffled coat, hunched back, reduced mobility, and moribund state.

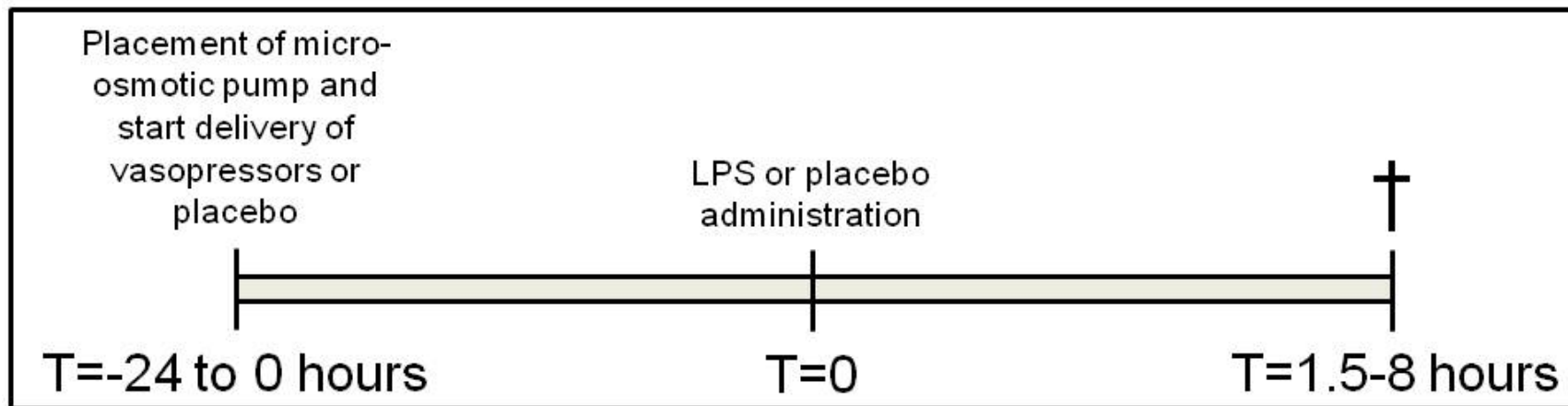
Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

---

A schematic overview of the procedures is provided in the figure at the bottom of this section.

Maximally 24 hours before LPS administration, mice will be anesthetized with isoflurane, a small incision will be made on the back of the mice, and the micro-osmotic pump will be placed subcutaneously and connected to the jugular vein for the continue infusion of vasopressors or placebo.

At T=0, mice will be injected with LPS (5 mg/kg) or placebo (saline). 1.5-8 hours post-administration, mice will be deeply anesthetized with isoflurane for exsanguination through orbital extraction followed by cervical dislocation, after which blood and organs will be harvested.





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 required to obtain statistical significance will be calculated using power calculations based on data from literature and previous experiments. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations. Naturally, during the course of this project, we will make use of the data obtained to further optimize the power calculations to prevent the use of too many or too little mice to reach our objectives. Power will be set at 80%, and alpha at 0.05. When required, Bonferroni correction will be used to correct for multiple testing.

The type of statistical tests used for analysis of the data obtained from this procedure is dependent on the nature of the data. For instance, cytokine levels between groups will be compared with unpaired t-tests or Mann-whitney U tests (2 groups, normally distributed data or non-normally distributed data, respectively), or one-way analysis of variance or Kruskal-Wallis with the appropriate post-hoc tests (more than 2 groups, normally distributed data or non-normally distributed data, respectively).

## **B. The animals**

---

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

---

*Species* Similar all our other experiments within this project, we will primarily make use of wild-type male C57BL/6J mice, aged 6-8 weeks. We use the male sex, because male mice do not have a variation in the hormonal cycle like female mice which affects the inflammatory response. It is well-known that in patients, gender influences the immune response during sepsis (recently reviewed in (1)). Women display better outcome of sepsis compared with men, and this is ascribed to sex hormones (1). Furthermore, in the LPS (2, 3) and CLP (4) models in mice, immunologic effects of sex hormones and differences between the sexes have been demonstrated. Therefore, the interindividual variation is expected to be lower when we only use male mice, which in turn results in smaller group sizes. Before the translation to the clinical situation can be made, targeted studies will have to be performed in both male and female animals.

The choice to use mice is based on the fact that they are the lowest animal species with an immune system that is recognized to be sufficiently comparable to that of humans(5). As such, mice, and in particular the C57BL/6J strain, have been extensively used in studies into the immune system, and a large number of tools and assays are available.

### *Origin*

We will generally obtain our mice from registered EU breeding companies. If mice have a different origin, they will be imported taking all applicable rules of the facility where the experiments will be performed into account.

### *Estimated numbers*

We expect to be able to reach our objectives with a group size of maximally 12 animals.

The estimated maximum number of mice in this procedure is 1296, based on the following (also see flowchart in section A1):

- To evaluate the effects of noradrenaline, we require 36 groups à 432 mice (2X2X3X3 design).
- To evaluate the effects of vasopressin and phenylephrine over noradrenaline, we require 72 groups à 864 mice (2X4X3X3 design).

Please note that this is the maximum numbers of mice. The number will likely be lower, as definitive group size will be based on power calculations, and placebo groups from earlier experiments in this animal procedure might be used in later experiments.

*Life stages*

Our experiments will be performed in young mice (1.5-6 months old).

1. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. Virulence. 2014;5(1):12-9.
2. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, et al. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. Cell. 1995;80(3):401-11.
3. Rettew JA, Huet YM, Marriott I. Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. Endocrinology. 2009;150(8):3877-84.
4. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. Crit Care Med. 1997;25(1):106-10.
5. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(4):1167-72.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57BL/6J mice	registered EU breeding companies	1296	1.5-6 months old

**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*

Due to the complex nature of the immune system, and the intricate ways through which different subsets immune cells interact *in vivo*, our objectives cannot be achieved without animal studies. To the best of our knowledge, no *in vitro* systems or computer models exists that can accurately mimic the *in vivo* situation. Mice are the lowest animal species with an immune system that is recognized to be sufficiently comparable to that of humans(1). Furthermore, a large number of tools and assays are available.

### *Reduction*

Our experiments are designed to keep the numbers of mice used as low as possible. However, to be able to draw firm conclusions, we will need a sufficient group size. Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery. In case necessary, a biostatistician will be involved in the power calculation. We will make optimal use of the material from each mouse and combine experiments where possible.

### *Refinement*

Placement of the microosmotic pump will be performed under general anesthesia. Mice will only suffer from the LPS-induced inflammatory response for a short period of time (maximum of 8 hours). Furthermore, mice will be deeply anesthetized before they are sacrificed, which is associated with minimal discomfort. All animal procedures will be performed by experienced researchers/biotechnicians/caretakers to keep the discomfort for the mice as low as possible. The procedures used are reported in the literature to yield reliable data. During the course of the project, we will further refine the procedures according to the results obtained. Also, cage enrichment will be used in all experiments.

### **References**

1. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(4):1167-72.

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

---

In addition to the items mentioned under "refinement", the extra precautions that are taken to reduce discomfort are:

- Mice will be housed together as much as possible. Randomization will be performed as early in the experiments as possible, and re-randomization will be prevented if the experimental setup allows it. This will prevent unnecessary disturbance of social structures.
- Frequent check-up of the mice before and during the experiments will prevent unnecessary 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.

---

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.

---

Placement of the micro-osmotic pump will be performed under general anesthesia, so this will not result in pain. The wounds from surgery will cause pain.

Development of an inflammatory response after LPS administration will cause (inflammatory) pain. Furthermore, mice will experience some pain caused by the administration of LPS/placebo depending on the route of administration (intraperitoneal, or intravenous). Before they are sacrificed, mice will be deeply anesthetized, so this is not accompanied by pain. Mice will be taken out of the experiment preliminary if humane endpoints are reached.

Pain resulting from surgery can be ameliorated by analgesics. Whether LPS-induced inflammatory pain can be ameliorated by analgesics is nevertheless unknown. Analgesics can influence the immune response. As the pain from surgery will be simultaneous to the inflammatory pain resulting from LPS the benefits of analgesics are therefore not certain, but use of them can confound our results. Therefore, we wish not to use them in these short-term experiments.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

---

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

---

- Stress
- Discomfort due to surgery
- Illness-related symptoms: solitary behavior, hypothermia, loss of body weight, and rapid breathing
- Recovery from anesthesia

- Euthanasia

Explain why these effects may emerge.

---

Stress will be induced by transportation of mice to the animal facility, handling before injections, injections, euthanasia, illness. Surgery will cause discomfort due to ligatures, agraves etc. Development of an inflammatory response after LPS administration will be accompanied by illness, characterized by solitary behavior, hypothermia, loss of body weight, and rapid breathing.

Mice will experience some discomfort caused by the administration of LPS/placebo depending on the route of administration (intraperitoneal, or intravenous).

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

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments starts the animals will be housed for a week in order to acclimatize to their new environment.

In case sutures and/or agraves unexpectedly cause severe ulceration or infection, the animal may experience severe discomfort and will be taken out of the experiment. We expect that this will happen in less than 1% of the animals.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal, but it will only occur once. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

Before they are sacrificed, mice will be deeply anesthetized.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

Mice will be taken out of the experiment preliminary if humane endpoints are reached.

## **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.

---

Humane endpoint are defined as:

- Severe breathing difficulties.
- Abnormal behavior and/or strongly reduced mobility.
- Pre-moribund state and severe suffering.
- Unforeseen complications of surgery, LPS administration, or administration of vasopressors.
- If the animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment (e.g. injuries/wounds/infections).
- If the animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the CCD.
- If (reliable and applicable) results cannot be achieved because of the conditions not related with the experiment.
- The objective of the experiment has been reached.

All above described criteria could be manifested in case of complication of disease. If any of this states is determined, mice will be sacrificed.

Indicate the likely incidence.

---

Less than 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 ).

---

Moderate for 100% of mice, all mice will undergo surgery for the microosmotic pump placement. Mice that receive LPS will have additional discomfort due to the inflammatory response, but this will not reach the "severe" classification.

## **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.

---

Mice need to be killed for harvesting of organs to evaluate our endpoints.

| 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure CLP model for immunoparalysis

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

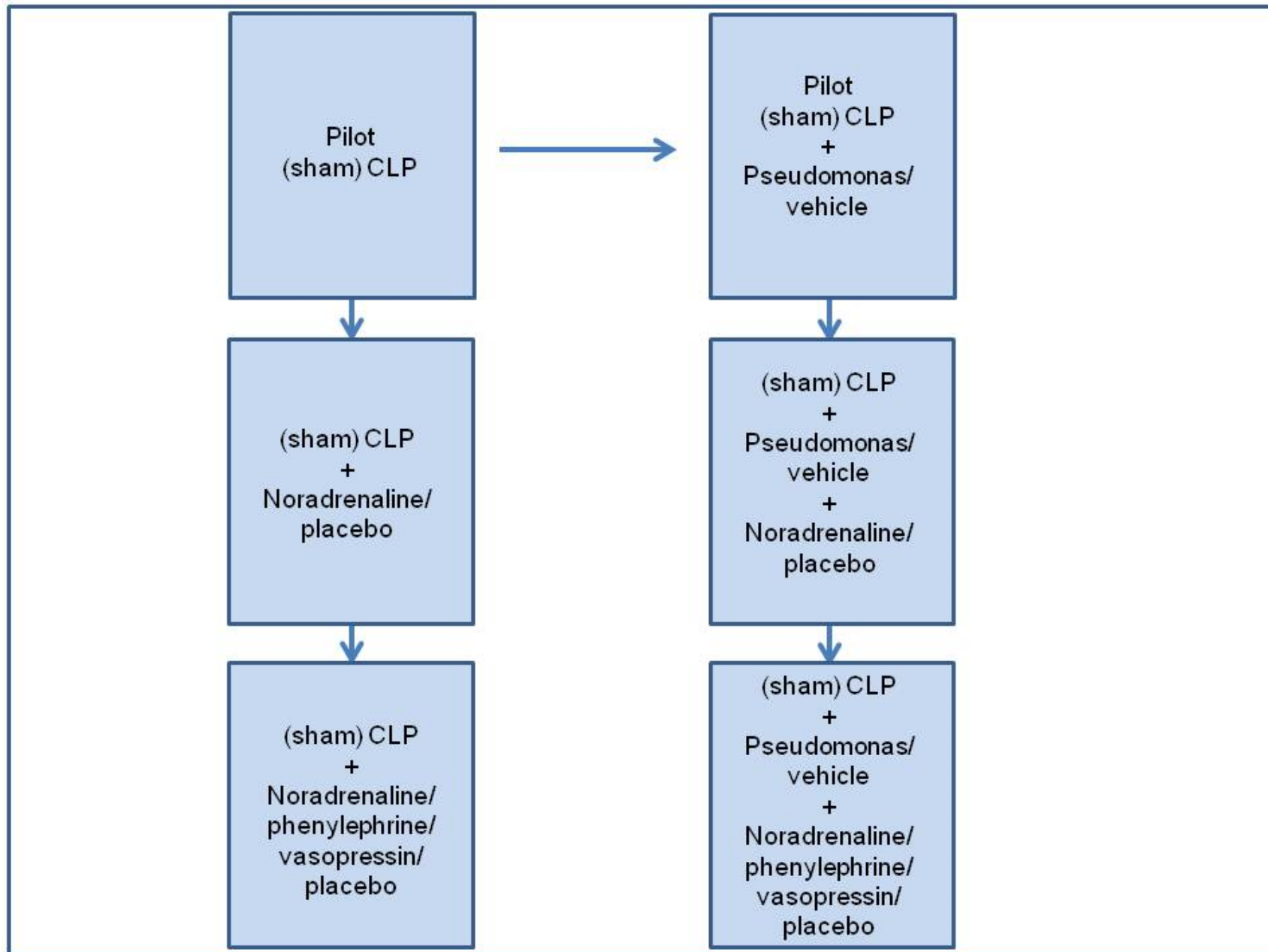
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

---

This animal procedure is aimed at investigating the contribution of noradrenaline to the development of immunoparalysis and the putative superior effects of vasopressin and/or phenylephrine. This will be evaluated in both primary infection, for which we will use the cecal ligation and puncture model (CLP, the gold standard model of sepsis (1)), and secondary infection, for which mice will be infected with *Pseudomonas Aeruginosa* after CLP. *Pseudomonas Aeruginosa* is one of the most prevalent causative organism of secondary pneumonia in sepsis patients(1, 2). A detailed description of the procedures is provided in section A2.

As the CLP and CLP+*Pseudomonas* models are currently not operational in our institute, we will set up these models in pilot experiments. By the time this AP is executed, we will have experience with the micro-osmotic pump, as it has been used in the previously performed animal procedure 1. The flowchart of this animal procedure including go/no-go points (indicated by arrows) is provided below. We will start with pilot experiments to set up the CLP model. We will make use of a maximum of 3 different puncture sizes, which corresponds to 3 different grades of severity, to identify the optimal grade of severity. We will start with the puncture size previously described by a collaborating group (1) and only use other sizes when this size does not fit our needs. Once the CLP model is set-up, experiments in which we evaluate the effects of noradrenaline during primary infection (CLP/sham CLP) will be carried out. If we demonstrate that noradrenaline indeed contributes to immunoparalysis in primary infection, we will subsequently move on to the experiments in which phenylephrine and/or vasopressin are compared with noradrenaline during primary infection (CLP/sham CLP).

After the successful setup of the CLP model, we will also start pilot experiments to set up the CLP+*Pseudomonas* model using a maximum of 3 different dosages of *P. Aeruginosa* to identify the optimal infection dose. Subsequently, the effects of noradrenaline and subsequently (only if noradrenaline indeed contributes to immunoparalysis in secondary infection) alternative vasopressors will be determined in the combination model (CLP+*Pseudomonas*).



*Primary outcome parameter:*

- Bacterial load in blood/tissues to assess clearance and thus susceptibility towards the infection as a functional measure of immunoparalysis.

*Secondary outcome parameters:*

- Flow cytometric analysis of different cell populations obtained from blood/tissues to assess cell surface markers and functionality (the latter after *ex vivo* restimulation). This will provide whether or not immunoparalysis is present and, if so, in what compartments.
- Pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma and various tissues, to measure local and systemic inflammatory effects.
- Gene expression profiles in various tissues.
- Histology of various tissues.
- Markers of organ damage (MPO, creatinin, urea, AST, ALT etc.), measured in blood/tissues.
- Clinical parameters: Weight, body temperature, ruffled coat, hunched back, reduced mobility, and moribund state.

## References

1. de Haan JJ, Pastille E, Wirsdorfer F, Lubbers T, Greve JW, Zhang Y, et al. Lipid-rich enteral nutrition improves the defense against an opportunistic infection during polymicrobial sepsis. *Shock*. 2014;41(2):109-14.
2. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011;139(4):909-19.

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

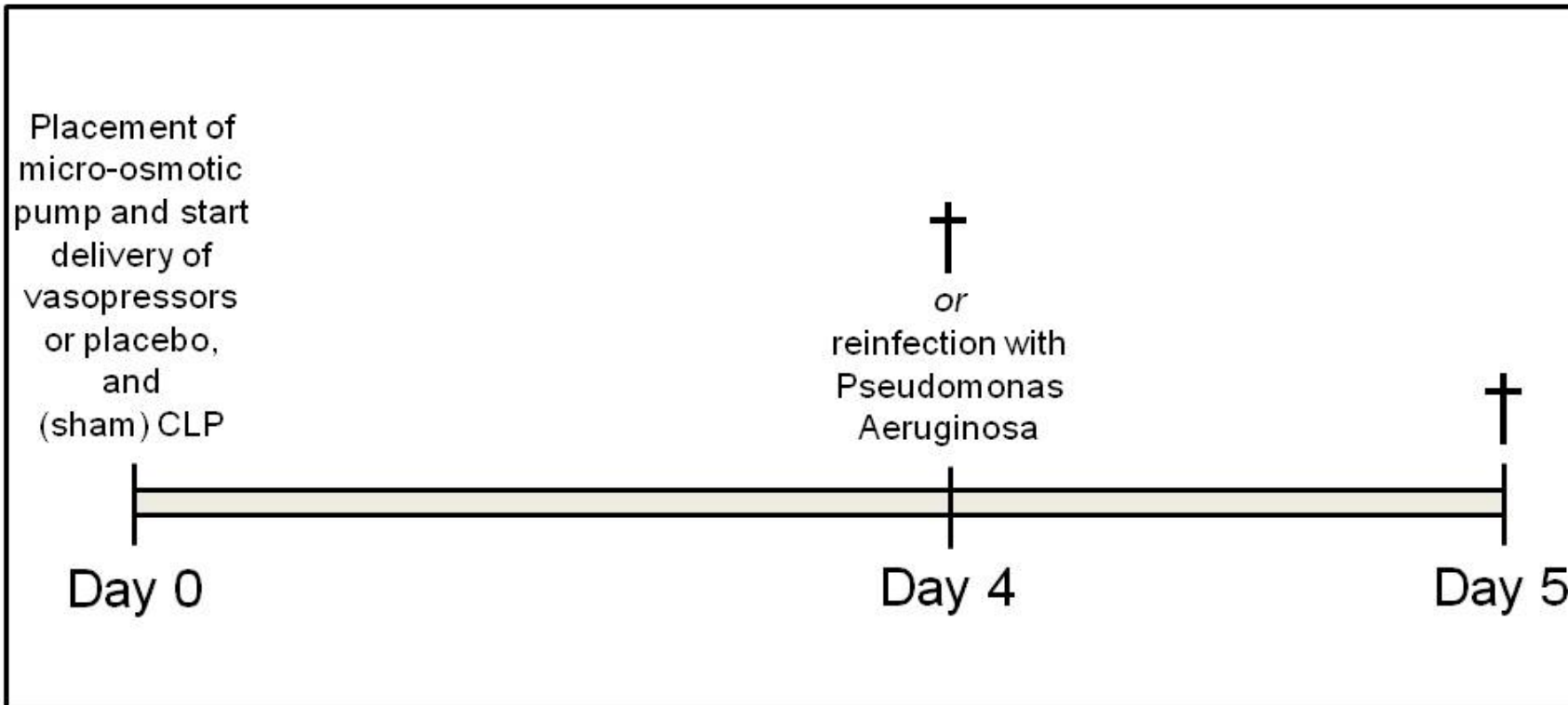
---

A schematic overview of the procedures (including all possible elements) is provided in the figure at the bottom of this section.

At day 0, mice will be anesthetized with isoflurane, a small incision will be made on the back of the mice, and the micro-osmotic pump will be placed subcutaneously and connected to the jugular vein for the continue infusion of vasopressors or placebo. Immediately afterwards, mice will undergo CLP. In more detail, the cecum of mice will be ligated and perforated to allow the release of fecal material into the peritoneal cavity, generating a polymicrobial infection that spreads systemically. Sham mice will undergo the same surgical procedure without ligation or puncture (sham).

At day 4, mice will be either:

- Deeply anesthetized with isoflurane for exsanguination through orbital extraction followed by cervical dislocation, after which blood and organs will be harvested. This elucidates the role of vasopressors in primary infection.
- Reinfected with *Pseudomonas Aeruginosa* to elucidate the role of vasopressors in secondary infection. For this, mice will be anesthetized with isoflurane and infected intranasally with placebo (saline) or *Pseudomonas Aeruginosa*. 24 hours post-infection, mice will be deeply anesthetized with isoflurane for exsanguination through orbital extraction followed by cervical dislocation, after which blood and organs will be harvested.



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 required to obtain statistical significance will be calculated using power calculations based on data from literature (1) and previous experiments. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations. Naturally, during the course of this project, we will make use of the data obtained to further optimize the power calculations to prevent the use of too many or too little mice to reach our objectives. Power will be set at 80%, and alpha at 0.05. When required, Bonferroni correction will be used to correct for multiple testing.

The type of statistical tests used for analysis of the data obtained from this procedure is dependent on the nature of the data. For instance, cytokine levels between groups will be compared with unpaired t-tests or Mann-whitney U tests (2 groups, normally distributed data or non-normally distributed data, respectively), or one-way analysis of variance or Kruskal-Wallis with the appropriate post-hoc tests (more than 2 groups, normally distributed data or non-normally distributed data, respectively).

#### **References**

1. de Haan JJ, Pastille E, Wirsdorfer F, Lubbers T, Greve JW, Zhang Y, et al. Lipid-rich enteral nutrition improves the defense against an opportunistic infection during polymicrobial sepsis. *Shock*. 2014;41(2):109-14.

#### **B. The animals**

---

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

---

*Species* Similar all our other experiments within this project, we will primarily make use of wild-type male C57BL/6J mice, aged 6-8 weeks. We use the male sex, because male mice do not have a variation in the hormonal cycle like female mice which affects the inflammatory response. It is well-known that in patients, gender influences the immune response during sepsis (recently reviewed in (3)). Women display better outcome of sepsis compared with men, and this is ascribed to sex hormones (3). Furthermore, in the LPS (4, 5) and CLP (6) models in mice, immunologic effects of sex hormones and differences between the sexes have been demonstrated. Therefore, the interindividual variation is expected to be lower when we only use male mice, which in turn results in smaller group sizes. Before the translation to the clinical situation can be made, targeted studies will have to be performed in both male and female animals.

The choice to use mice is based on the fact that they are the lowest animal species with an immune system that is recognized to be sufficiently comparable to that of humans(7). As such, mice, and in particular the C57BL/6J strain, have been extensively used in studies into the immune system, and a large number of tools and assays are available.

#### *Origin*

We will generally obtain our mice from registered EU breeding companies. If mice have a different origin, they will be imported taking all applicable rules of the facility where the experiments will be performed into account.

### *Estimated numbers*

We expect to be able to reach our objectives with a group size of maximally 20 animals (based on a literature (1)) . The estimated maximum number of mice in this procedure is 960, based on the following (also see flowchart in section A1):

- To set up the CLP model (evaluation of effects of different puncture sizes in CLP [maximum of 3]), we require 4 groups à 80 mice (sham + CLP with 3 different puncture sizes).
- To set up the CLP+Pseudomonas Aeruginosa model (evaluation of different dosages of Pseudomonas Aeruginosa [maximum of 3]), we require 8 groups à 160 mice (2X4 design).
- To evaluate the effects of noradrenaline during primary infection (CLP/sham CLP), we require 4 groups à 80 mice (2X2 design).
- To evaluate the effects of noradrenaline during secondary infection (CLP/sham CLP followed by Pseudomonas Aeruginosa or vehicle), we require 8 groups à 160 mice (2X2X2 design).
- To evaluate the putative superior effects of vasopressin and phenylephrine over noradrenaline during primary infection (CLP/sham CLP), we require 8 groups à 160 mice (2X4 design).
- To evaluate the effects of the putative superior effects of vasopressin and phenylephrine over noradrenaline during secondary infection (CLP/sham CLP followed by Pseudomonas Aeruginosa or vehicle), we require 16 groups à 320 mice (2X2X4 design).

Please note that these are maximum numbers of mice. The numbers will likely be lower, as we have various go/no-go points, definitive group size will be based on power calculations, and sham/placebo groups from earlier experiments in this animal procedure might be used in later experiments. Furthermore, we will only use both vasopressin and phenylephrine if these alternative vasopressors show equally less immunosuppressive effects compared with noradrenaline in AP1 of this project. Otherwise, only the least immunosuppressive alternative will be used.

### *Life stages*

Our experiments will be performed in young mice (1.5-6 months old).

### **References**

1. de Haan JJ, Pastille E, Wirsdorfer F, Lubbers T, Greve JW, Zhang Y, et al. Lipid-rich enteral nutrition improves the defense against an opportunistic infection during polymicrobial sepsis. *Shock*. 2014;41(2):109-14.
2. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011;139(4):909-19.
3. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*. 2014;5(1):12-9.
4. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, et al. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*. 1995;80(3):401-11.
5. Rettew JA, Huet YM, Marriott I. Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology*. 2009;150(8):3877-84.
6. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. *Crit Care Med*. 1997;25(1):106-10.
7. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(4):1167-72.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57BL/6J mice	registered EU breeding companies	960	1.5-6 months old

### 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

Due to the complex nature of the immune system, and the intricate ways through which different subsets immune cells interact *in vivo*, our objectives cannot be achieved without animal studies. To the best of our knowledge, no *in vitro* systems or computer models exists that can accurately mimic the *in vivo* situation. Mice are the lowest animal species with an immune system that is recognized to be sufficiently comparable to that of humans(3). Furthermore, a large number of tools and assays are available.

#### Reduction

Our experiments are designed to keep the numbers of mice used as low as possible. However, to be able to draw firm conclusions, we will need a sufficient group size. Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery. In case necessary, a biostatisticaion will be involved in the power calculation. We will make optimal use of the material from each mouse and combine experiments where possible.



### *Refinement*

Surgery for CLP, placement of the micro-osmotic pump, as well as infection with *Pseudomonas Aeruginosa* will be performed under general anesthesia, so this will not result in major discomfort. The polymicrobial infection cause by CLP and the pneumonia caused by *Pseudomonas Aeruginosa* will last for a relatively short period of time (4 days and 24 hours, respectively). Furthermore, mice will be deeply anesthetized before they are sacrificed, which is associated with minimal discomfort. All animal procedures will be performed by experienced researchers/biotechnicians/caretakers to keep the discomfort for the mice as low as possible. The procedures used are reported in the literature to yield reliable data. During the course of the project, we will further refine the procedures according to the results obtained. Also, cage enrichment will be used in all experiments. Mice will be taken out of the experiment preliminary if humane endpoints are reached. Those mice will not be replaced.

### **References**

3. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(4):1167-72.

---

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

In addition to the items mentioned under “refinement”, the extra precautions that are taken to reduce discomfort are:

- Mice will be housed together as much as possible. Randomization will be performed as early in the experiments as possible, and re-randomization will be prevented if the experimental setup allows it. This will prevent unnecessary disturbance of social structures.
- Frequent check-up of the mice before and during the experiments will prevent unnecessary 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.

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.

---

CLP, placement of the micro-osmotic pump, and Pseudomonas Aeruginosa infection will be performed under general anesthesia, so this will not result in major pain. The wounds from surgery and development of infection after CLP and Pseudomonas Aeruginosa infection will cause (inflammatory) pain. Before they are sacrificed, mice will be deeply anesthetized, so this is not accompanied by pain. Mice will be taken out of the experiment preliminary if humane endpoints are reached.

Pain resulting from surgery can be ameliorated by analgesics. Whether CLP- or Pseudomonas Aeruginosa-induced inflammatory pain can be ameliorated by analgesics is nevertheless unknown. Analgesics can influence the immune response. As the pain from surgery will be simultaneous to the inflammatory pain resulting from the infection, the benefits of analgesics are therefore not certain, but use of them can confound our results. Therefore, we wish not to use them in these short-term experiments.

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

---

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

---

- Stress
- Discomfort due to surgery
- Illness-related symptoms: solitary behavior, hypothermia, loss of body weight, and rapid breathing
- Recovery from anesthesia
- Euthanasia

Explain why these effects may emerge.

---

Stress will be induced by transportation of mice to the animal facility, handling before surgery, (recovery from) inhalation anesthesia, injections, euthanasia, illness.

Surgery will cause discomfort due to ligatures, agraues etc.

Development of infection after CLP and Pseudomonas Aeruginosa infection will be accompanied by severe illness, characterized by solitary behavior, hypothermia, loss of body weight, and rapid breathing.

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

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments starts the animals will be housed for a week in order to acclimatize to their new environment.

In case sutures and/or agraues unexpectedly cause severe ulceration or infection, the animal may experience severe discomfort and will be taken out of the experiment. We expect that this will happen in less than 1% of the animals.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

Before they are sacrificed, mice will be deeply anesthetized.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

Mice will be taken out of the experiment preliminary if humane endpoints are reached.

## **J. Humane endpoints**

---

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

---

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

---

Mice will be monitored daily, weighed, temperature recorded (non-invasive) and scored according their condition using a Scoring and Weight sheet (used parameters are: weight, body temperature, ruffled, coat, hunched back, reduced mobility, and moribund).

Humane endpoint are defined as:

- Loss of body weight of more than 15% in 1-2 days or more than 20% from the start of the experiment, according to the international guidelines of humane endpoints.
- Severe breathing difficulties.
  
- Abnormal behavior and/or strongly reduced mobility.
- Pre-moribund state and severe suffering.
- Unforeseen complications of surgery or infections, or administration of vasopressors.
- If the animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment (e.g. injuries/wounds/infections).
- If the animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the CCD.
- If (reliable and applicable) results cannot be achieved because of the conditions not related with the experiment.
- The objective of the experiment has been reached.

All above described criteria could be manifested in case of complication of disease. If any of this states is determined, mice will be sacrificed.

Indicate the likely incidence.

---

Less than 10%.

## **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 ).

---

Moderate for 33% of mice à groups that undergo sham CLP and are not infected with Pseudomonas. These will still undergo surgery.  
Severe for 67% à CLP and/or Pseudomonas infections.

## **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.

---

Mice need to be killed for harvesting of organs to evaluate our endpoints.

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

---

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

---

Yes

---

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0118
2. Titel van het project: The contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis
3. Titel van de NTS: De bijdrage van noradrenaline aan verlamming van het afweersysteem bij bloedvergiftiging
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 22-12-2015
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 11-01-2016 en 02-02-2016
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 18-01-2016 tot 25-01-2016 en van 09-02-2016 tot 10-02-2016
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 25-01-2016 en 10-02-2016
  - advies aan CCD: 24-02-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 18-01-2016
  - Strekking van de vragen:

### Project Proposal:

-2.1 De commissie is van mening dat het beschreven onderzoek niet translationeel maar basaal onderzoek is naar de mechanismen achter de verminderde afweer bij IC patiënten. De experimenten in dierproef 4 en 5 zullen een bevestiging kunnen geven van de gevonden resultaten, maar zijn te summier om te kunnen spreken van translationeel onderzoek.

-3.1 Er zijn meerdere factoren die bijdragen aan de verminderde afweer bij IC patiënten. Waarom kiezen de onderzoekers voor deze éne mediator (PDL1-positieve neutrofielen), deze éne conditie (hypoxie), en dit éne medicijn (noradrenaline)? En wat is de samenhang tussen deze drie factoren in relatie tot de verminderde afweer? Indien deze factoren niet onderling samenhangen, dan vraagt de DEC zich af of deze aanvraag beschouwd kan worden als een toetsbare eenheid.

-3.2 De hoofddoelstelling is een algemene doelstelling, waarvan het lastig te voorspellen is of die behaald zal worden met dit onderzoek. De tweede doelstelling betreft toepassing in de kliniek en ligt nog erg ver van de eerste doelstelling af, waardoor de haalbaarheid daarvan vrijwel niet in te schatten is door de commissie. Ook het formuleren van 10 subdoelstellingen draagt niet bij tot de overzichtelijkheid. De onderzoekers worden verzocht een goed afgebakende doelstelling te formuleren, en de haalbaarheid van die doelstelling binnen de looptijd van het project toe te lichten. De commissie betwijfelt of de subdoelstellingen die opgesomd worden bij het onderdeel 'hypoxia' in 5 jaar haalbaar zijn.

-3.4.2 De onderzoekers gebruiken voor dierproef 2 en 3 het LPS-model, terwijl voor dierproef 1 het CLP-model wordt gebruikt. Kunnen de onderzoekers uitleggen waarom zij verschillende modellen willen gebruiken en niet alleen het 'golden standard model' voor sepsis?

-3.4.3 Dierproef 1, 2 en 3 starten parallel, hetgeen impliceert dat er geen onderlinge samenhang is. De aanvragers verwijzen voor een schematisch overzicht van de samenhang tussen de verschillende dierproeven naar het schema bij 3.4.1. Deze figuur lijkt echter de afwezigheid van enige samenhang of onderlinge beïnvloeding tussen de drie onderzochte factoren in respectievelijk AP1, AP2/AP4, en AP3/AP5 te bevestigen. De genoemde 'cross-over' elements (laatste alinea) waaruit de samenhang zou kunnen blijken, zijn onvoldoende toegelicht. Wanneer het drie onafhankelijke onderzoekslijnen betreft, kunnen de onderzoekers dan een hiërarchie aanbrengen? Welke hypothese is het meest kansrijk en zou als eerste onderzocht moeten worden? Wat zijn de overwegingen om de volgende hypothese te gaan onderzoeken? Bij parallelle uitvoering worden de onderzoekers verzocht duidelijker uit te leggen waaruit de onderlinge samenhang bestaat (zie ook de vraag over 3.1).

#### **Description of Animal Procedures:**

##### **DAP1**

-A1: De commissie mist een duidelijke toelichting op de flowchart, met onder andere een beschrijving van de overwegingen bij de go/no go momenten. Op zichzelf staand vindt de commissie de figuur op p3/64 onbegrijpelijk.

-B: De onderzoekers willen uitsluitend mannen gebruiken voor hun dierproeven, omdat vrouwen een hormonale cyclus hebben die de afweerreactie zou kunnen beïnvloeden. Kunnen de onderzoekers literatuurreferenties geven waaruit deze beïnvloeding blijkt? Zij zouden in het genoemde pilot experiment kunnen uitzoeken of er verschillen in immuunrespons optreden tussen mannen en vrouwen in dit model.

-J en K: De beschreven mortaliteit en morbiditeit komen niet overeen met de gegeven referentie (de Haan et al). Hieruit blijkt dat deze procedure leidt tot 20% mortaliteit/HEP en tot ernstige ziekte bij alle dieren die CLP ondergaan (all mice showed signs of severe illness within 24 h after CLP). De commissie is van mening dat alle dieren in de CLP-groepen ernstig

ongerief zullen ondervinden, ook al is dat van voorbijgaande aard. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.

Uit tijdsoverwegingen heeft de commissie besloten de andere bijlagen met dierproeven en de niet-technische samenvatting nog niet tot in detail te bespreken. De onderzoekers worden verzocht na te gaan welke opmerkingen over DAP1 ook van toepassing zijn op de andere dierproeven en deze waar nodig aan te passen.

- Datum antwoord: 25-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

**Project Proposal:**

-2.1 Ik ben het eens met de commissie en heb het type onderzoek gewijzigd naar “basaal onderzoek”.

-3.1 Naar aanleiding van deze opmerking van de commissie heb ik besloten in deze aanvraag de onderdelen PD-L1 en hypoxie weg te laten en deze eventueel in toekomstige aanvragen te verwerken. Nu bestaat de aanvraag slechts uit onderzoek naar effecten van noradrenaline en alternatieve vasopressors op sepsis-geïnduceerde immunoparalyse. Hier zijn ook geen behandelexperimenten in opgenomen. We onderzoeken slechts de effecten van meerdere vasopressors.

-3.2 Omdat ik in het herziene project de onderdelen PD-L1 en hypoxie heb weggelaten is de doelstelling veel specifiek geworden en de haalbaarheid vergroot.

-3.4.2 In het herziene projectvoorstel wil ik wederom zowel het LPS als het CLP (+ Pseudomonas) model toepassen. Hier is nu ook een duidelijke fasering in aangebracht. Eerst zullen de immunomodulerende effecten van de verschillende vasopressors onderzocht worden in het (veel minder belastende) LPS model. Deze informatie zal dan worden gebruikt om de experimenten in de meer klinisch relevante maar ook meer belastende CLP (+ Pseudomonas) modellen vorm te geven. Dit staat nu uitgebreid beschreven in het projectvoorstel.

-3.4.3 Dit is niet meer van toepassing omdat ik de onderdelen PD-L1 en hypoxie heb weggelaten.

**Description of Animal Procedures:**

-A1: Dit is alleen van toepassing op AP2, omdat hier nog go/no-go momenten in het AP zitten. Ik heb daar een duidelijke toelichting met de overwegingen voor de go/no-go punten toegevoegd.

-B: In mensen heeft geslacht effecten op de afweerreactie tijdens sepsis, dit is in verscheidene studies aangetoond (recent gereviewd in (1)). Vrouwen hebben een betere outcome van sepsis dan mannen, en dit wordt toegeschreven aan geslachtshormonen. Ook in experimentele modellen in muizen (waaronder het LPS model (2, 3) en CLP (4)) zijn immunologische effecten van geslachtshormonen en verschillen tussen de geslachten aangetoond. Het gebruiken van beide geslachten zou dus leiden tot meer variatie en het gebruik van (veel) grotere groepen. Veder, om dezelfde redenen als hierboven aangegeven, maken we bij het LPS model bij de mens wat we op onze afdeling loopt, ook alleen gebruik van mannen. We willen de resultaten uit dit dierexperimentele project vertalen naar de mens, onder andere gebruik makend van het LPS model bij de mens. Daarom hebben we



gekozen om alleen mannelijke dieren te gebruiken in dit project. We hebben dit verwerkt in de APs. Het is echter niet te verwachten dat de effecten van de interventies heel verschillend zijn tussen mannen en vrouwen. Uiteindelijk is het doel om een klinische studie te doen bij patiënten met sepsis, deze zal zowel mannen als vrouwen includeren.

-J en K: We zijn het eens met de commissie en hebben dit aangepast. Verder hebben we de groepsgrootte voor de CLP (+Pseudomonas) experimenten aangepast aan de hand van de studie van de Haan et al (5).

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 09-02-2016

- Strekking van de vragen:

**Niet-technische samenvatting:**

-3.5: Vijf dagen ernstig ongerief is niet kort. De commissie adviseert u dit weg te laten.

-4.4 De maatregel om ongerief voor de dieren te beperken is voor leken niet begrijpelijk beschreven.

**Project Proposal:**

-3.1 Wat is de rationale voor de keuze van vasopressin en fenylefrine? Kunnen de onderzoekers uitleggen waarom zij minder immuunsuppressie verwachten van deze middelen waarbij de receptoren en onderliggende signaling pathways voor beide middelen worden betrokken?

-3.4.3 De onderzoekers willen vaststellen of noradrenaline in vivo een immuunsuppressief effect heeft. Wanneer noradrenaline geen immuunsuppressief effect heeft, is er geen reden om de proeven met vasopressine en fenylefrine in het LPS model uit te voeren. De commissie is van mening dat dit ook een go/no go moment voor dit onderzoek inhoudt, en verzoekt de onderzoekers dit toe te voegen aan de figuur op pagina 9/11 en in sectie 3.4.2 waar de opzet van dierproef 1 wordt beschreven.

-3.4.3 De commissie vindt de huidige benaming van de dierproeven wat verwarrend. Zij adviseert de onderzoekers een eenvoudiger variant te gebruiken, zoals: 'LPS model for immunosuppression' voor AP1 en 'CLP model for immunoparalysis' voor AP2.

**Description of Animal Procedures:**

DAP1

-A2: Wat is de dosering van het LPS en op welke wijze wordt het geïnjecteerd? Het effect van LPS is sterk dosisafhankelijk en heeft consequenties voor het ongerief van de dieren en de frequentie van humane eindpunten.

-B: De Commissie adviseert u de zin 'We feel that the use... such as ours' hier en ook in DAP2 te verwijderen.

-K: Het ongerief volgend op de toediening van LPS ontbreekt nog in de beschrijving.

DAP2

-A1: In het genoemde model is de grootte van de naald al vastgelegd. Waarom willen de onderzoekers drie verschillende laesiegroottes onderzoeken? De commissie is van mening dat het effect van de grootte van de laesie in het coecum al eerder vastgesteld is.

- Datum antwoord: 10-02-2016
- Strekking van de antwoorden:

**Project Proposal:**

-3.1 Zoals beschreven in sectie 3.1, alinea “noradrenaline and immunoparalysis”, worden de immuussuppressieve effecten van (nor)adrenaline gemedieerd door beta-adrenerge receptoren (de effecten worden namelijk teniet gedaan door beta-blokkers). Vasopressine en fenylefrine werken niet via beta-adrenerge receptoren: vasopressine grijpt aan op V1 en V2 receptoren, en fenylefrine is een selectieve alfa-adrenerge receptoragonist. Van stimulatie van deze receptoren is niet bekend dat ze het immuunsysteem remmen. Ik heb dit nu verduidelijkt in sectie 3.1.

-3.4.3 Ik ben het eens met de commissie en heb dit go/no-go moment toegevoegd alsmede de figuur op pagina 9/11. De text in sectie 3.4.2 heb ik niet gewijzigd omdat deze niet verandert, de go/no-go punten staan hier namelijk niet vermeld (ook niet bij AP2). Wel heb ik sectie DAP1 aangepast en hierin tevens een flowchart toegevoegd met het go/no-go moment.

-3.4.3 Akkoord, ik heb dit aangepast.

**Description of Animal Procedures:**

DAP1

A2: Mij is verteld dat dit detailniveau (doseringen) niet noodzakelijk is in projectaanvragen. Edoch, er zal gebruik gemaakt worden van 5 mg/kg LPS. Dit hebben we in al onze voorgaande experimenten gebruikt en is in overeenstemming met het beschreven ongerief. Ik heb dit nu vermeld in DAP1.

B: Akkoord, ik heb deze zin verwijderd.

K: Ik heb het ongerief tengevolge van LPS toediening toegevoegd.

DAP2

A1: De grootte van de naald/laesie staat alleen in de literatuur beschreven. Wij hebben dit model nog nooit uitgevoerd in ons centrum en het effect van verschillende laesiegroottes dus nog niet vastgesteld. Zoals u waarschijnlijk weet is er grote variatie in uitkomsten in verschillende settings. Daarom willen we bij het opzetten van dit model de vrijheid behouden om het model in onze setting te optimaliseren door gebruik te kunnen maken van drie laesiegroottes. We zullen echter wel starten met de laesiegrootte zoals beschreven in de literatuur. Deze laatste overweging heb ik toegevoegd aan DAP2.

**Niet-technische samenvatting:**

3.5: Akkoord, ik heb dit verwijderd.

4.4 Ik heb dit nu begrijpelijker opgeschreven.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies

- Expert advies

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig.
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. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to identify whether noradrenaline contributes to sepsis-induced immunoparalysis in animal models that are relevant to the critically ill patient, and if the alternative vasopressors phenylephrine and/or vasopressin are superior in this respect.' De te behalen onderzoekresultaten zullen duidelijk maken of noradrenaline de afweer onderdrukt in muismodellen voor sepsis. Indien dit het geval is, zal onderzocht worden of fenylefrine en vasopressine de afweer in gelijke mate onderdrukken in deze modellen. Sepsis komt regelmatig voor (bij 20 miljoen patiënten per jaar wereldwijd). Dit kan leiden tot een septische shock, waaraan 30% van de patiënten overlijdt. Het verlamde afweersysteem van sepsis-patiënten is meestal de oorzaak van een fatale afloop. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang omdat duidelijk wordt of een middel dat standaard gegeven wordt bij septische shock bijdraagt aan de fatale verlamming van het immuunsysteem, en of alternatieve middelen deze bijwerking niet hebben. De DEC acht het verbeteren van de behandeling van sepsis-patiënten van substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep en haar (internationale) samenwerkingspartners hebben veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. Er is voldoende financiering voor het uitvoeren van dit onderzoeksvoorstel en de translatie van positieve resultaten naar de kliniek. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare inzichten in het effect van vasopressoren op het verloop van primaire en secundaire infecties bij muismodellen voor sepsis.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door het sepsis-model. Het ongerief als gevolg van het verbloeden onder anesthesie schat de commissie in als licht. De DEC schat het ongerief als gevolg van de operatie om de mini-osmotische pomp te plaatsen en van de injectie met LPS in als matig. De commissie schat het ongerief als gevolg van de punctie van het coecum en de intranasale infectie met *Pseudomonas* in als ernstig. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor 65% van de dieren en ernstig voor 35% van de dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of

door gebruik van minder complexe diersoorten. Het effect van medicijnen op de afweer tegen sepsis of longontsteking kan niet goed onderzocht worden zonder proefdieren. Het immuunsysteem van muizen lijkt voldoende op het immuunsysteem van mensen, waardoor de resultaten vertaalbaar zijn naar patiënten.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door experimenten waar mogelijk te combineren en door het inbouwen van een aantal goed omschreven go/no go momenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 2256 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, zodat de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Effecten zullen eerst in een minder belastend diermodel worden onderzocht. De onderzoekers zullen het meer belastende diermodel alleen gebruiken indien er positieve resultaten in het minder belastende model worden gevonden. Door de korte looptijd van de experimenten wordt het ernstig ongerief zoveel mogelijk beperkt. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

#### **D. Ethische afweging**

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het effect van vasopressoren op het verloop van primaire en secundaire infecties bij muismodellen voor sepsis. Het belang van meer inzicht in het ontstaan van een verlamd immuunsysteem bij sepsispatiënten acht de DEC substantieel, gezien de prevalentie van deze ernstige ziekte en de hoge mortaliteit van septische shock.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 65% van de dieren matig ongerief en 35% van de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aangebrachte sepsismodel en de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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 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

### **2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.**



> 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  
AVD103002016447

**Bijlagen**

2

Datum 25 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016447. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300  
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████  
KvK-nummer: 41055629  
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10  
Postbus: 9101, t.a.v. ██████████  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
IBAN: NL90ABNA0231209983  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 24 maart 2016  
Geplande einddatum: 24 maart 2021  
Titel project: Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options  
Titel niet-technische samenvatting: Een verlamd afweersysteem in ernstig zieke patiënten; bijdragende factoren en behande  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

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

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

24 februari 2016



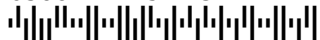
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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  
AVD103002016447

**Bijlagen**

2

Datum 25 februari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 25 februari 2016

Vervaldatum: 26 maart 2016

Factuurnummer: 16700447

Ordernummer: 040823-461220/2015-0118/

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016447	€ 741,00

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

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 4 april 2016 13:48  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Uw aanvraag AVD103002016447  
**Bijlagen:** 2015-0118NTS.pdf

LS,

Dank voor de beoordeling en uw geringe commentaar. Bij deze de aangepaste NTS.

MvG

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

**Radboud university medical centre**

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]

Geert Grooteplein 10 [REDACTED]

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

In office: monday to friday 09.00 – 17.00

---

**Van:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Verzonden:** maandag 4 april 2016 9:05  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** Postbus instantie voor dierenwelzijn  
**Onderwerp:** Uw aanvraag AVD103002016447

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft uw aanvraag tot projectvergunning getiteld Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options met aanvraagnummer AVD103002016447 besproken in de vergadering. De CCD is voornemens uw projectaanvraag te vergunnen. Voor dat de vergunning verstuurd wordt willen wij u vragen een zin uit uw Niet Technische Samenvatting te herformuleren. U gebruikt in de NTS bij punt 4.2 vermindering de uitdrukking "als er muziek in zit" dit vind de commissie ongelukkig gekozen in de context van de wetenschappelijke achtergrond en dierproeven. Zou u ons een herziene versie van de NTS willen sturen?

Zodra de NTS is ontvangen sturen wij de vergunning aan u toe.

Vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

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

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.  
The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

p/a  
Postbus 9101  
6500 HB Nijmegen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002016447

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 7 april 2016  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 24 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options" met aanvraagnummer AVD103002016447. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 4 april 2016 hebben wij u gevraagd om een zin uit de Niet Technische samenvatting te herformuleren. Op 4 april 2016 heeft u een aangepaste NTS ingediend.

De titels van de projectvoorstel en de NTS komen niet overeen met de titels zoals genoemd op het aanvraagformulier. De titel genoemd op de project voorstel en het DEC advies is: 'The contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis'. Wilt u bij vervolgaanvragen erop toezien dat de titels op de aanvraag en de overige documenten overeen komen?

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options" starten. De vergunning wordt afgegeven van 7 april 2016 tot en met 24 maart 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt. Aanvullend stelt de CCD twee algemene voorwaarden om te voldoen aan datgene wat voort komt uit artikel 10a. van de wet. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Beoordeling achteraf**

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden wegens ongerief classificatie ernstig, 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.

**Datum**  
7 april 2016

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002016447

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij nemen het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

In aanvulling hierop worden de twee algemene voorwaarden gesteld die aan meerjarige projecten worden verbonden. 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**  
7 april 2016

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002016447

### **Bezwaar**

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

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

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

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

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

### **Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

### **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 woonplaats: 6500 HB NIJMEGEN  
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 april 2016 tot en met 24 maart 2021, voor het project "Immunoparalysis in critically ill patients; contributing factors and treatment options" met aanvraagnummer AVD103002016447, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 24 februari 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 24 februari 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 4 april 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 24 februari 2016, ontvangen op 24 februari 2016;

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
LPS model for immunosuppression	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6J mice	1296	Matig
CLP model for immunoparalysis	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6J mice	960	67% Ernstig 33 % matig

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2022 plaatsvinden.

### Algemene voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

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

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

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

**Datum**

7 april 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD103002016447

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

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

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

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

**Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2022 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van de dierproeven conform de vergunning waren.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 19 april 2016 16:18  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** terugkoppeling besluit AVD103002016447

Geachte leden van RU DEC,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project : The contribution of noradrenaline to sepsis-induced immunoparalysis met aanvraagnummer AVD103002016447.

De CCD heeft op basis van uw advies besloten de aanvraag te vergunnen. Ook conform uw advies is aan deze vergunning de verplichting verbonden tot het indienen van een beoordeling achteraf vanwege de ongeriefclassificatie ernstig.

De CCD dankt u voor uw uitgebreide advies,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

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

Inventaris Wob-verzoek W16-13S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016451</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud			x					
6	DEC-advies			x					
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Mail verzoek aanpassing 23-3-2016				x		x	x	
9	Projectvoorstel herzien			x					
10	Niet-technische samenvatting herzien	x							
11	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien			x					
12	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien			x					
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Mail terugkoppeling DEC 19-4-2016				x		x	x	



29 FEB 2016

1

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>3 0 2 4 4 1 9 7</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7									
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7																
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><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Instatie voor Dierenwelzijn</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Instatie voor Dierenwelzijn	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
Straat en huisnummer	Instatie voor Dierenwelzijn																
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.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 0 4 . 2 0 1 6 |
| Einddatum  | 0 1 . 0 4 . 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Preventie en behandeling van gewrichtsschade na een bloeding
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.187,00 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
- Literatuurlijst. Bijlage beschrijving dierproeven (I) en fok met ongerief (II)

## 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 gehuust en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

[Redacted Name]

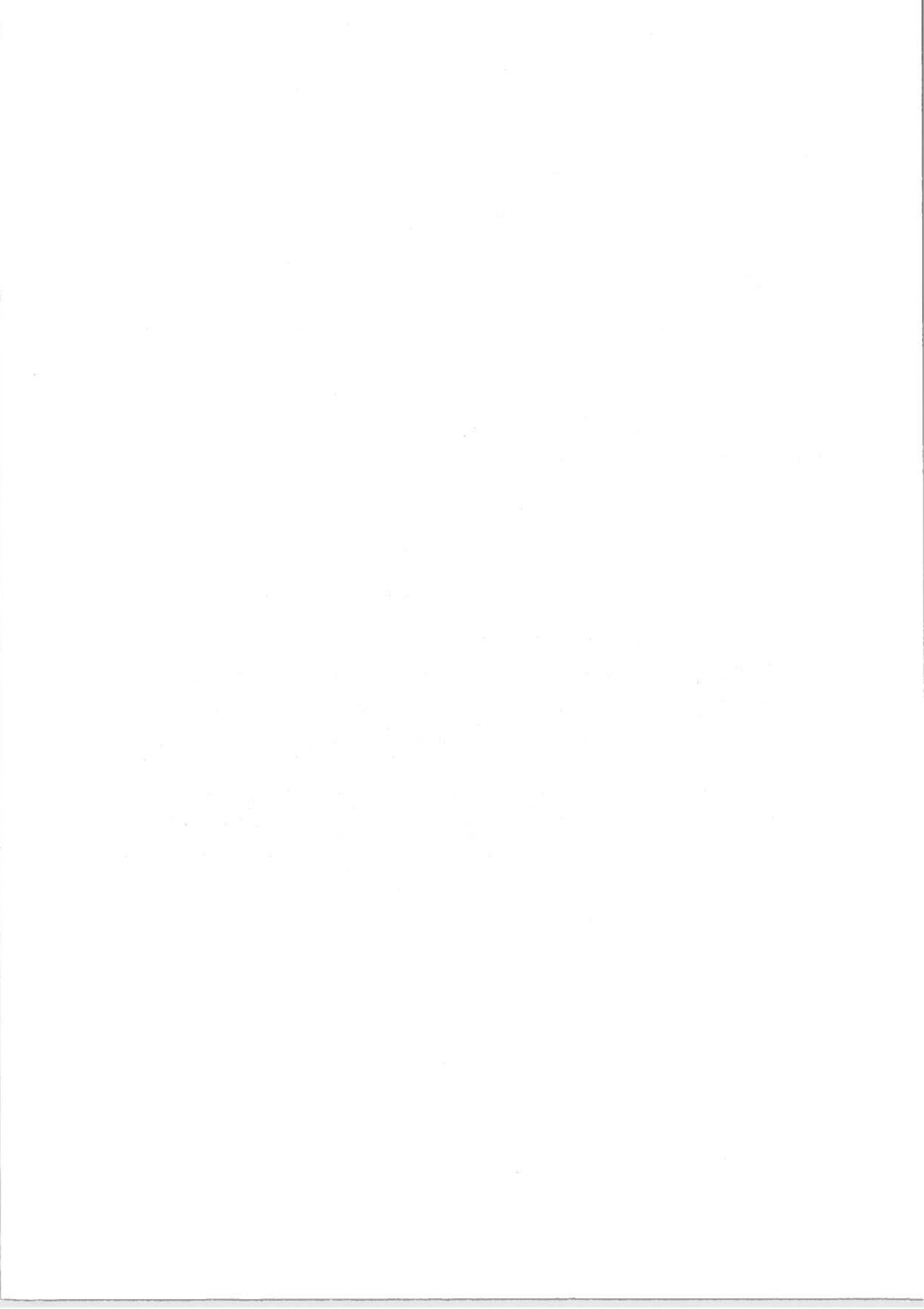
[Redacted Function]

Utrecht

23-02-2016

[Redacted Signature]







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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

Gewrichtsbloedingen kunnen ontstaan als gevolg van trauma [1] of operatie [2], maar worden ook gezien in het kader van artrose [3], pigmented villonodular synovitis [4] of ziekten met een verhoogde bloedingsneiging zoals hemofilie [5]. Ongeacht de oorzaak, veroorzaakt recidiverende hemartrose kraakbeenschade en chronische inflammatie van het synovium en resulteert uiteindelijk in bloed-geïnduceerde artropathie [6]. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat naast inflammatie onder andere ijzer, dat bij een bloeding intra-articulair vrijkomt uit erythrocyten, daarbij een cruciale rol speelt [7].

Hemofilie wordt beschouwd als de prototypische ziekte die model staat voor de pathobiologie van bloed-geïnduceerde artropathie [8]. Hemofilie is een erfelijke X-linked recessieve stollingsfactordeficiëntie van factor VIII (Hemofilie A) en IX (Hemofilie B) [9]. Patiënten met ernstige hemofilie (FVIII/IX < 1%) krijgen frequent spontane gewrichtsbloedingen, waarbij de knieën, ellebogen en enkels het vaakst zijn aangedaan [10]. Met stollingsfactorconcentraat kan het aantal gewrichtsbloedingen bij hemofiliepatiënten worden gereduceerd, maar niet geheel voorkomen worden [11]. Daarnaast is stollingsfactor-concentraat slechts in een beperkt aantal landen beschikbaar vanwege de hoge kosten. Wereldwijd heeft de meerderheid van de hemofiliepatiënten geen toegang tot deze behandeling. Verder ontwikkelt 1/3 van de hemofiliepatiënten antistoffen tegen het stollingsfactorconcentraat (remmers) [12]. Voor deze patiëntengroep is geactiveerd prothrombine complex concentraat of recombinant factor VIIa beschikbaar, maar deze behandeling is duur en minder effectief waardoor er evengoed herhaaldelijke gewrichtsbloedingen kunnen ontstaan [13]. Daarom zijn nieuwe vormen van therapie voor bloed-geïnduceerde gewrichtsschade noodzakelijk.

De afgelopen jaren is door onze groep kennis vergaard over de pathogenese van gewrichtsbloedingen en zijn de eerste stappen naar mogelijke nieuwe behandelingen bestudeerd. Een aantal voorbeelden hier van zijn:

- A) Deferasirox is een orale ijzerchelator, die voornamelijk via de faeces de excretie van ijzer bevordert [17]. Deferasirox wordt reeds gebruikt bij patiënten met ijzerstapelingsziekten. Gezien de centrale rol van ijzer bij het ontstaan van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade, zou deferasirox een aantrekkelijke behandeling kunnen zijn. In eerder onderzoek lijkt profylactisch gegeven deferasirox het kraakbeen te beschermen bij hemartrose geïnduceerd in hemofilie muizen [18].
- B) Van interleukine-1 $\beta$  (IL1b) is aangetoond dat het een cruciale factor is in de ontwikkeling van bloed-geïnduceerde kraakbeenschade *in vitro*. Het blokkeren van deze pro-inflammatoire cytokine met een monokonaal antilichaam beschermt het kraakbeen tegen schadelijke effecten bij blootstelling aan bloed [16]. Het remmen van de productie van IL1b zou dus ook *in vivo* een behandelingsoptie kunnen zijn.
- C) Het IL4-10 synerkine is een fusie-eiwit bestaande uit IL-4 en IL-10. Van IL-4 en IL-10 is bekend dat ze de productie van pro-inflammatoire cytokines die vrijkomen bij een gewrichtsbloeding, zoals IL-1 $\beta$ , IL-6 en TNF- $\alpha$ , remmen [14]. Een combinatie van IL-4 en IL-10 *in vitro* voorkomt gewrichtsschade na een geïnduceerde bloeding [15] en zou daarmee ook *in vivo* een behandelingsmodaliteit kunnen zijn.

Hoewel de benoemde opties hoopvol zijn, is verder onderzoek naar de verschillende interventies die gewrichtsschade na een bloeding kunnen voorkomen of reduceren nodig om de translatie naar humane kliniek te kunnen maken. Om de pathogenese beter te begrijpen en eventueel nieuwe behandeltarget te

ontdekken, is er meer kennis nodig over het effect van de interventies op (systemische) inflammatie en kraakbeenschade na een bloeding. Om dit verder te kunnen onderzoeken zijn er diverse experimenten nodig in een diermodel voor bloed-geïnduceerde gewrichtsschade, in zogenaamde hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J). Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor humane hemofilie.

### 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 doelstelling van dit onderzoeksproject is het verkrijgen van inzicht in de pathogenese van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Daarnaast wordt het effect onderzocht van verschillende interventies gericht op het voorkomen of behandelen van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Deze interventies zijn: ijzerchelatoren, IL1b-receptorantagonisten en IL4-10 synerkine. Translatie naar een betere behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade en het verminderen van de daarmee samenhangende morbiditeit in de kliniek staat hierbij voorop.

### 3.3 Belang

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

Ongeacht de oorzaak van de gewrichtsbloedingen, leidt bloed-geïnduceerde artropathie tot ernstige morbiditeit. Bij hemofiliepatiënten is het één van de meest voorkomende complicaties en heeft grote gevolgen. Patiënten ervaren chronische pijn, bewegingsbeperkingen, invaliditeit en een verminderde kwaliteit van leven, vaak al op een zeer jonge leeftijd (minder dan 30 jaar) [19]. Uiteindelijk is vaak orthopedisch ingrijpen noodzakelijk [20,21]. Chirurgische procedures worden echter bemoeilijkt door de verminderde hemostase en zijn bovendien erg kostbaar. Derhalve is het nodig om nieuwe behandelingen van bloed-geïnduceerde artropathie te onderzoeken.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

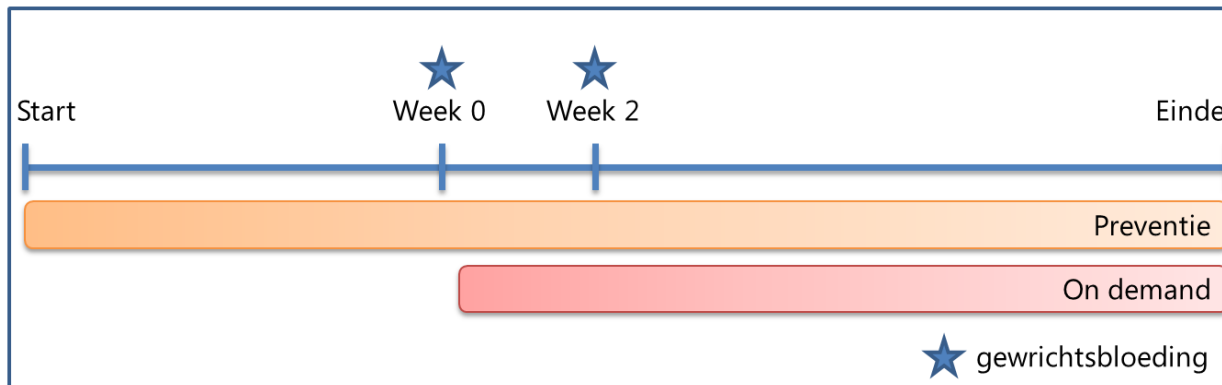
#### Algemene opzet

De verschillende interventies van dit project weerspiegelen verschillende mechanismen om in te grijpen in het proces van de bloed-geïnduceerde gewrichtsschade (zie figuur 2 bij 3.4.3). Per interventie zoals beschreven in 3.1 zullen een aantal experimenten worden opgezet. Bij die experimenten wordt de interventie ingezet als preventieve maatregel en bij succes als behandeling (*on demand*) getoetst. Hierbij zal er tevens een brede analyse naar de lokale en systemische effecten plaats vinden.

#### Model

Hemartrose wordt geïnduceerd in zogenaamde hemofilie muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J), naar het muismodel van Hakobyan [8]. Er is gekozen voor deze vorm van trauma gezien het relatief beperkte ongerief voor het dier en de opgedane ervaring binnen onze onderzoeksgroep. Hemofiliemuizen vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie. De hemofilie muizen, die drie tot vier maanden oud zijn, worden geanestheesd middels inhalatie anesthesie. Met een 30G naald wordt het kapsel van de rechter knie onder de patella gepuncteerd om een bloeding te induceren. De linker knie wordt niet aangedaan en geldt als een controle. Na twee weken wordt via dezelfde methode een tweede bloeding geïnduceerd.

In het geval dat de interventie preventief gegeven wordt, krijgen hemofiliemuizen de medicatie al *voor* de inductie van de gewrichtsbloeding. Eventueel wordt de interventie na de gewrichtsbloeding voor een bepaalde tijd voortgezet. In het geval dat de interventie als behandeling (*on demand*) wordt gegeven, wordt de interventie pas gestart *na* het induceren van de gewrichtsbloeding.



Figuur 1 – Tijdslijn experimenten Preventie en On demand

#### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameter is histologie post mortem, waarbij de mate van kraakbeenschade en inflammatie van het synovium vastgesteld worden. Secundaire uitkomstparameter is macroscopische inspectie, waarbij gekeken wordt naar de mate van zichtbare bloeding en gewrichtsdiameter. Tevens wordt bloed afgenomen middels een wangpunctie, waarbij verschillende inflammatoire parameters en biomarkers bepaald worden.

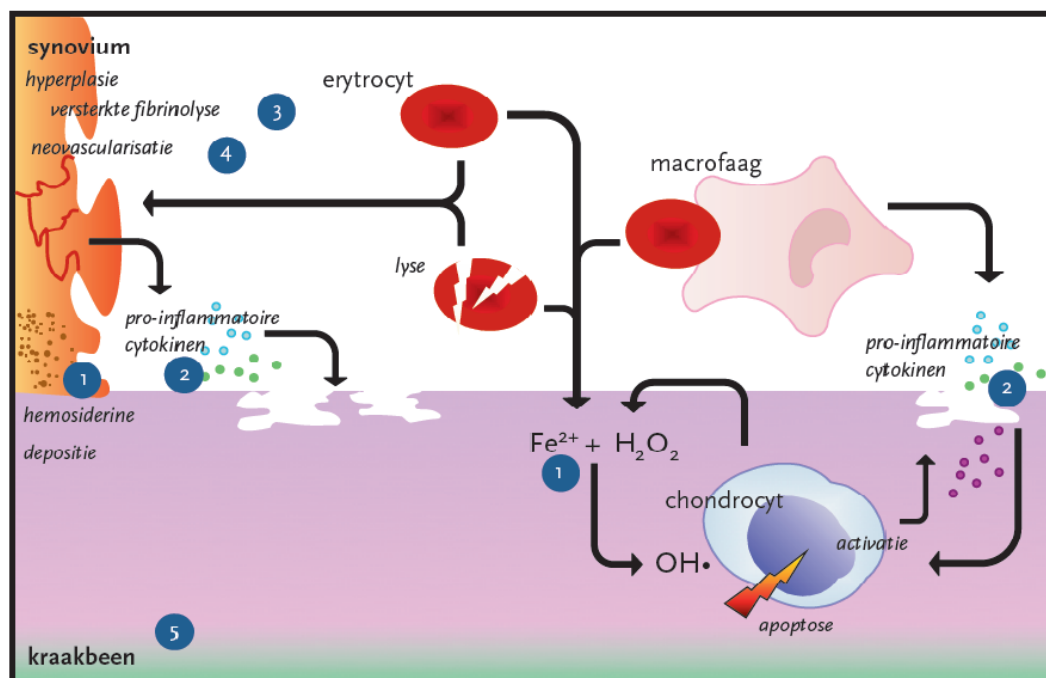
#### 3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

De verschillende onderdelen van het project:

- A) Interventie: ijzerchelator
  - Preventie (behandelen met ijzerchelator alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
  - On demand (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas ijzerchelator toegediend wordt)
- B) Interventie: IL1b-receptor antagonist
  - Preventie (behandelen met IL1b-receptor antagonist alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
  - On demand (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas IL1b-receptor antagonist toegediend wordt)
- C) Interventie: IL4-10 synerkine
  - Preventie (behandelen met IL4-10 synerkine alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
  - On demand (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas IL4-10 synerkine toegediend wordt)

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 pathogenese van bloed-geïnduceerde artropathie is complex. Op verschillende niveaus zou op dit proces ingegrepen kunnen worden. In onderstaand figuur [22] staat de pathogenese van bloed-geïnduceerde artropathie beschreven met mogelijke aangrijpingspunten voor potentiële nieuwe therapie. Vertaald naar onze studie grijpt interventie A (ijzerchelator) aan op nummer 1 en interventie B en C (IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) remmen de pro-inflammatoire cytokines van nummer 2.

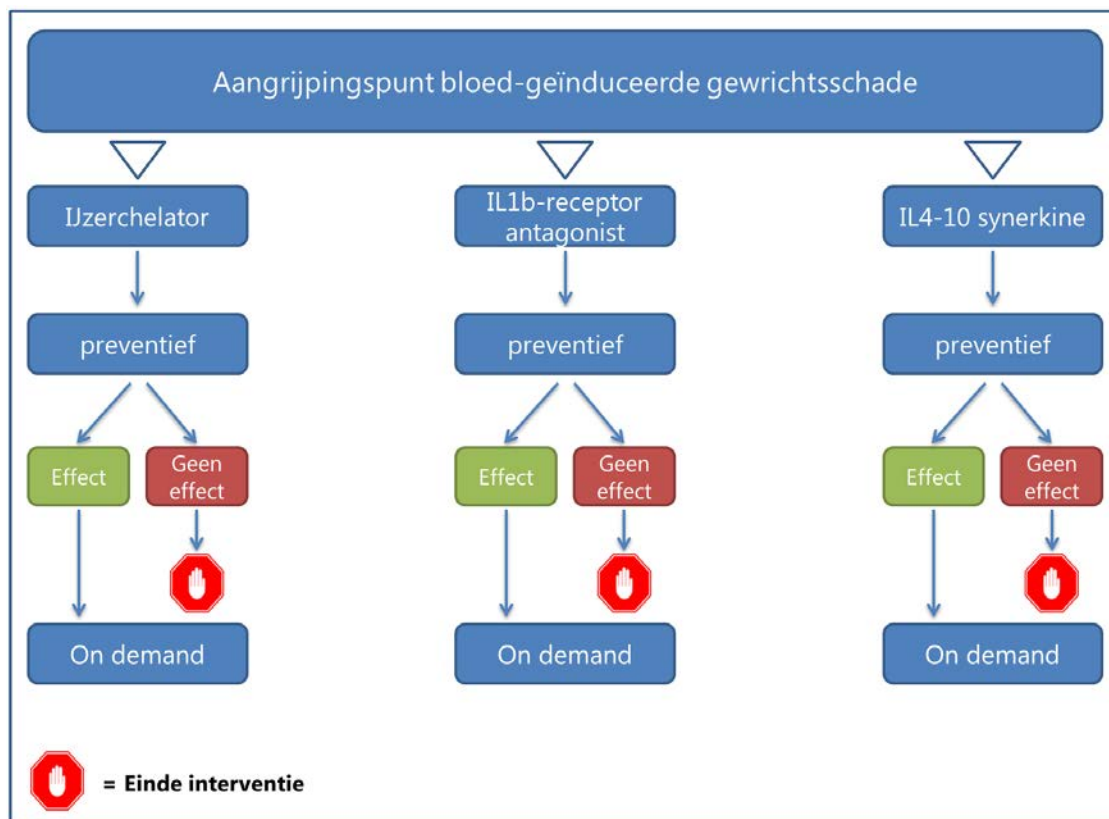


Figuur 2 - Pathogenese van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade en aangrijpingspunten voor potentiële nieuwe therapieën.

1: ijzerchelatie; 2: anti-inflammatoire therapie (IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine); 3: fibrinolysereimmers; 4: neoangiogeneseremmers; 5: kraakbeenregeneratie

Ons onderzoeksproject richt zich op ijzerchelatie en twee vormen van anti-inflammatoire therapie. In figuur 3 is de samenhang van de verschillende onderdelen van het project weergegeven. De experimenten die horen bij interventie A t/m C kunnen onafhankelijk van elkaar worden uitgevoerd. Allereerst wordt gekeken of de interventie effect heeft als het preventief gegeven wordt en daarmee bloedgeïnduceerde schade voorkomt. Bij een positieve bevinding wordt de *on demand* toediening getoetst.

De beperkte beschikbare capaciteit maakt dat we moeten kiezen met welke interventie we beginnen. Als eerste willen we de effecten van ijzerchelatie bestuderen, mede omdat dit middel al klinisch wordt toegepast bij ziektebeelden als hemochromatose en ijzerstapeling door herhaalde bloedtransfusie. Bij succes kan dit de translatie naar de humane kliniek bevorderen. Indien ijzerchelatie niet het gewenste resultaat oplevert, switchen we naar een andere interventie binnen dit project.



Figuur 3 – samenhang projectonderdelen

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Muismodel – Experimenten
2	Muismodel – Fok met ongerief
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Preventie en behandeling van gewrichtsschade na een bloeding
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Gewrichtsschade, gewrichtsbloeding, kraakbeen, synovium, therapie

## 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
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Dit onderzoek richt zich op het ontstaan en behandelen van schade door bloedingen in een gewricht. Gewrichtsbloedingen kunnen ontstaan als gevolg van een ongeluk of operatie, maar kunnen ook optreden door artrose of bloedziekten. Bloed veroorzaakt schade in het gewricht door onder andere het ontstaan van een ontstekingsreactie. Daarnaast speelt ook het vrijkomen van ijzer een rol bij het ontstaan van de schade.</p> <p>Patiënten met bloedingen in de gewrichten hebben vaak al op jonge leeftijd chronische pijn, bewegingsbeperking, invaliditeit en verminderde kwaliteit van leven. Uiteindelijk is vaak een gewrichtsvervangende operatie noodzakelijk. Daarom is een nieuwe behandeling voor schade door bloedingen in het gewricht dan ook zeer wenselijk.</p>
3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	<p>Binnen dit project gaan we met drie verschillende methodes op zoek naar een mogelijke behandeling voor schade door gewrichtsbloedingen. We onderzoeken of deze methoden werken bij muizen met hemofilie A, een erfelijke stoornis in de bloedstolling. Zo willen we bijdragen aan een betere behandeling van schade aan gewrichten als gevolg van bloedingen en het beperken van de gevolgen.</p>
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	<p>In totaal hebben we 470 muizen nodig.</p>
3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	<ul style="list-style-type: none"><li>- Omdat deze muizen hemofilie hebben, is er kans op bloedingen in bijvoorbeeld hun spieren. Vechten is bij deze dieren risicovol, omdat wonden extra kunnen gaan bloeden.</li><li>- De dieren krijgen gewrichtsbloedingen onder verdoving.</li></ul>
3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	<p>Ingeschat ongerief: we schatten het totaal in op matig.</p>
3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	<p>De dieren worden aan het eind van het experiment gedood.</p>

## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

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

We bestuderen het effect van verschillende behandelingen op het niveau van het gewricht zelf, maar ook in relatie met het hele lichaam. Dat kan alleen in het lichaam. Hemofilie in muizen gedraagt zich als hemofilie in de mens, wat de dieren geschikt maakt voor de experimenten.

### 4.2 **Vermindering**

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

Op basis van specifieke berekeningen zullen we per experiment het exacte aantal berekenen. Daarnaast zullen we tussentijds evalueren of het zinvol is om de experimenten voort te zetten.

### 4.3 **Verfijning**

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

Er zijn diverse dieren waarin hemofilie spontaan of via genetische modificatie voorkomt. Het voordeel van hemofiliemuizen, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de hond, is dat ze minder de neiging hebben tot spontaan bloeden in weefsels of gewrichten en er dus gericht onderzoek kan worden gedaan. Bovendien is eerder wetenschappelijk onderzoek in deze hemofiliemuizen gedaan, waardoor het vergelijken van resultaten gemakkelijker is. Er is ruime ervaring in onze onderzoeksgroep met dit onderzoeksmodel.

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

Mannelijke dieren huisvesten we in principe in groepsverband. Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes vanwege de verhoogde bloedingskans alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest.

Bij alle dieren wordt er extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van letsels.

De dieren worden verdoofd voordat we een gewrichtsbloeding bij ze veroorzaken, voordat we bloed afnemen en voordat we het gewricht gaan inspecteren.

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Muismodel - Experimenten</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Muismodel - Experimenten
Volgnummer	Type dierproef					
1	Muismodel - Experimenten					

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

###### Experimentele aanpak

Dit onderzoek kijkt naar verschillende methoden om in te grijpen in het proces van de schade die ontstaat na een gewrichtsbloeding. Tijdens de experimenten wordt gekeken naar het effect van de interventies (ijzerchelator, IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) op bloed-geïnduceerde artropathie. Bij de experimenten wordt de interventie eerst ingezet als preventieve maatregel, om vervolgens bij succes als behandeling (*on demand*) te worden getoetst. Hierbij zal tevens een brede analyse naar de lokale en systemische effecten plaats vinden.

### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameter is histologie post mortem, waarbij de mate van kraakbeenschade en inflammatie van het synovium vastgesteld wordt. Hiervoor worden de gevalideerde Valentino score [23] en Safranin O score [24] gebruikt. De resultaten worden blind beoordeeld door twee onderzoekers. Secundaire uitkomstparameter is macroscopische inspectie, waarbij gekeken wordt naar de mate van zichtbare bloeding en de gewrichtsdiameter. Tevens wordt bloed afgenomen middels een wangpunctie, waarbij verschillende inflammatoire parameters, biomarkers en genotype bepaald worden.

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

### Behandelingsduur

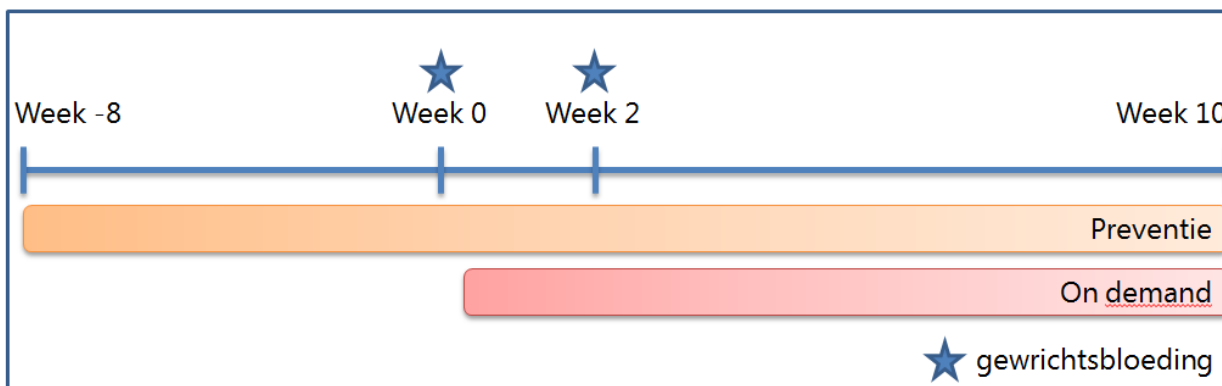
#### *Preventie*

Bij deze experimenten worden de hemofiliemuizen gerandomiseerd tussen de interventie of placebo. De muizen worden behandeld met de interventie tot maximaal 8 weken voor het induceren van de gewrichtsbloeding. In week 0 en week 2 wordt een gewrichtsbloeding geïnduceerd. De behandeling wordt gecontinueerd voor een periode van 10 weken na het induceren van de gewrichtsbloeding. De maximale duur van follow-up in het experiment kan variëren op basis van voortschrijdend inzicht (zowel korter als langer) en wordt specifiek gedefinieerd per experiment.

#### *On demand*

De hemofiliemuizen worden gerandomiseerd tussen de interventie of placebo. Er worden gewrichtsbloedingen geïnduceerd, waarna op een later moment gestart wordt met de interventie. Deze behandeling wordt voor een periode van 10 weken voortgezet. De frequentie van behandeling en maximale duur van follow-up in het experiment kan variëren op basis van voortschrijdend inzicht (zowel korter als langer) en zal per experiment worden gedefinieerd.

Bovenstaande opzet wordt verduidelijkt in figuur 1.



Figuur 1 – Tijdslijn experimenten Preventie en On demand

## Behandeling

De verschillende interventies worden op verschillende wijze toegediend. IL4-10 synerkine en IL1b-receptor antagonist worden intra-articulair gegeven (placebo: intra-articulaire injectie met alleen oplosmiddel). De ijzerchelator wordt opgelost in het drinkwater ('placebo': drinkwater zonder toevoeging).

Hemofilie muizen krijgen, in tegenstelling tot de humane situatie, geen spontane gewrichtsbloedingen. Daarom worden op een gecontroleerde manier gewrichtsbloedingen geïnduceerd naar het muismodel van Hakobyan [8]. De hemofiliemuizen worden verdoofd middels inhalatie anesthesie. Met een 30G naald wordt het kapsel van de rechter knie onder de patella gepuncteerd om een bloeding te induceren. De linker knie wordt niet aangedaan en geldt als een controle. Na twee weken wordt via dezelfde methode een tweede bloeding geïnduceerd. De muizen worden gedood door cervicale dislocatie.

Er is gekozen voor dit muismodel vanwege het relatief beperkte ongerief voor het dier en omdat eerder wetenschappelijk onderzoek gebruik maakte van dit model waardoor resultaten te vergelijken zijn. Bovendien is er ruime ervaring mee opgedaan binnen onze onderzoeksgroep.

---

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

Onze primaire outcome is de Valentino score, een gevalideerde histologische score voor de mate van gewrichtsschade ten gevolge van bloed. Deze score is een categorische score van 0 tot 10. Deze score zal door 2 personen worden uitgevoerd, wat de mogelijkheid geeft tot maximaal 20 categorische variabelen. In overleg met onze biostatisticus ██████████, eveneens verbonden aan het Julius centrum Utrecht, is een algemene vuistregel dat een categorische score van meer dan 5 punten als een continue variabele mag worden beschouwd. Mede op basis van deze vuistregel en onderstaande aannames, die onder andere gebaseerd zijn op onze vorige experimenten met dit model, komen we uit op de volgende algemene sample-size berekening:

Op basis van eerder gedane experimenten is de verwachting dat een minimale effect-size van 0.8 (groot; effect size tussen behandelde poot versus placebo behandelde poot) als klinisch relevant gezien kan worden. Op basis van een alpha van 0.05, een power van 0.8 waarbij 2 onafhankelijke groepen vergeleken worden op 1 primaire outcome, is de verwachting dat groepen van 26 dieren nodig zijn per experiment om een relevant verschil aan te kunnen tonen (berekend met G-power).

**t tests** - Means: Difference between two independent means (two groups)

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

<b>Input:</b>	Tail(s)	=	Two
	Effect size d	=	0.8
	$\alpha$ err prob	=	0.05
	Power (1- $\beta$ err prob)	=	0.8
	Allocation ratio N2/N1	=	1
<b>Output:</b>	Noncentrality parameter $\delta$	=	2.8844410
	Critical t	=	2.0085591
	Df	=	50
	Sample size group 1	=	26
	Sample size group 2	=	26
	Total sample size	=	52
	Actual power	=	0.8074866.

Op basis van vorige experimenten verwachten we een uitval van 10% (tot 20%). Daarmee is de verwachting dat we groepen van 30 dieren nodig hebben. Omdat dergelijke groepen te groot zijn om logistiek goed te kunnen hanteren zullen de experimenten gefaseerd worden uitgevoerd. Per stap zal worden bekeken of voortzetting van het experiment zinvol is. Voor de precieze aantallen zal er per experiment een sample size analyse uitgevoerd worden.

## B. De dieren

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

Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J) worden verkregen uit het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Dit zijn genetisch gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie en zijn daarmee een uniek model voor het bestuderen van bloed-geïnduceerde artropathie. De muizen vertonen geen spontane bloedingen, waardoor het model zich leent voor het controleerbaar induceren van gewrichtsbloedingen.

De dieren worden gefokt in het Gemeenschappelijk Dieren Laboratorium (GDL) van de Universiteit Utrecht. Voor de experimenten worden dieren gebruikt tussen de 3 en 4 maanden oud. Zowel mannetjes als vrouwtjes worden ingezet. Per interventie worden er twee type experimenten gedaan (preventief en on demand). Elk type experiment vereist twee groepen: een interventie en placebo groep. De verwachting is dat er per groep 30 dieren nodig zijn. Daarmee komt het verwachte aantal op 360 dieren (3 interventies x 2 type experimenten x 2 groepen per experiment x 30 = 360 dieren). Daarbij komen de vrouwelijke dieren die nodig zijn voor de fok. Per experiment worden 18 fokvrouwtjes gebruikt = 3 interventies x 2 type experimenten x 18 = 108 dieren. De fokmannen kunnen in het experiment worden ingezet. Zie bijlage 2.B.

De motivatie voor de inzet van proefdieren ligt in het feit dat *in vitro* experimenten een beperkte afspiegeling vormen van de *in vivo* situatie bij zo'n complexe pathogenese als bloed-geïnduceerde artropathie. Er zijn geen alternatieven voor handen. Humane studies bij hemofiliepatiënten naar dit onderwerp zijn ethisch en technisch niet haalbaar.

## 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: Proeven *in vitro* vormen een beperkte afspiegeling van de omstandigheden *in vivo* bij zo'n complex proces als het ontstaan van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Bovendien willen we het effect van verschillende methodes bestuderen op het niveau van het gewricht zelf, maar ook in relatie met het lichaam als geheel. Er zijn geen alternatieve modellen voor handen (search: Pubmed, Go3R). Hemofilie in hemofilie A muizen gedraagt zich als hemofilie in de mens, waardoor de dieren uitermate geschikt zijn voor de experimenten. Humane studies op dit onderwerp bij hemofiliepatiënten zijn ethisch niet haalbaar.

Vermindering: Hoewel hemofilie in de mens vrijwel alleen bij mannen voorkomt, gebruiken we voor deze experimenten zowel mannetjes als vrouwtjes omdat het genotype dat toelaat. Het gebruik van beide geslachten draagt bij aan het verminderen van het fokoverschot.

Op basis specifieke sample size berekeningen zal per experiment het exacte aantal dieren berekend worden. De verwachting is dat 30 dieren per groep nodig zijn om met voldoende zekerheid een uitspraak te kunnen doen over een specifieke interventie. Daarbij wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door spontane of traumagerelateerde bloedingen ingecalculleerd moet worden. Omdat dergelijke groepen te groot zijn om logistiek goed te kunnen hanteren zullen dergelijke experimenten gefaseerd worden uitgevoerd en per fase bekeken worden of voortzetting van het experiment zinvol is.

*In vitro* experimenten en/of literatuur studie vormen de basis van de doseringen die gebruikt worden in de experimenten, zodat we zo gericht mogelijke dosering kunnen toepassen. Deze voorstudies zorgen er dus voor dat het aantal dieren kan worden verminderd.

Verfijning: Er zijn diverse dieren waarin hemofilie spontaan of via genetische modificatie voorkomt. Zo zijn er hond en muismodellen, die bruikbaar zijn voor preklinische studies *in vivo*. Modellen in ratten, schapen en duiven zijn minder uitgewerkt.

Het voordeel van het muismodel is dat hemofiliemuizen, in tegenstelling tot de hond, minder de neiging hebben tot spontaan bloeden in weefsels of gewrichten. Dit geeft een betere controle over de experimentele condities. Verder is er eerder wetenschappelijk onderzoek in deze hemofiliemuizen gedaan, waardoor het vergelijken van resultaten gemakkelijker is. Daarnaast is er reeds ruime ervaring met dit muismodel in onze onderzoeksgroep opgedaan en is geleerd van eerdere welzijnsevaluaties. Een voorbeeld is dat vrouwtjes maximaal 2 nestjes mogen krijgen, omdat er na meerdere nestjes een grotere kans op overlijden leek te zijn. Sinds het instellen van deze maatregel is er geen oversterfte van de fokvrouwen meer voorgekomen.

---

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.

---

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest. Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressie-gerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest. Bij alle dieren wordt er extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerd trauma.

De dieren worden verdoofd voor het induceren van de gewrichtsbloeding en het inspecteren van het gewricht.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

---

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

---

## Huisvesting en verzorging

## F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest, maar bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressiegerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband 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.

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De dieren worden geanestheseerd voorafgaand aan de handelingen als inspectie van de gewrichtsdiameter, bloedafname en gewrichtspuncties. In eerdere experimenten van onze groep is de mate van ongerief na een gewrichtspunctie zeer gering gebleken, derhalve wordt geen additionele pijnstilling gegeven.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Ten gevolge van het genotype kans op wekedelen bloedingen; agressie- en/of traumagerelateerde bloedingen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak ligt in het genotype van de muis; de stollingsfactor VIII deficiëntie.

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

Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannelijke dieren vanaf de leeftijd van zes weken alleen gehuisvest. Bij alle dieren wordt extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerde bloedingen.

#### 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 specifiek voor deze studie:

- Ernstige verwondingen / wekedelen bloedingen door agressie of trauma (Hemofiliemuizen bloeden in principe niet spontaan).
- Intra-articulaire ontsteking ten gevolge van lokale behandeling bij interventie arm B en C (kans hier op klein maar mogelijk).

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

Op basis van welzijnsevaluatie 2012 en eerdere ervaringen: 10%.

#### K. Classificatie van ongerief

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

Ingeschat ongerief gedurende de studie:

- Induceren gewrichtsbloeding x 2: gering
- Bloedafname: gering
- Behandeling middels intra-articulaire toediening: gering (behandeling middels orale toediening: geen ongerief)
- Risico op trauma/agressie gerelateerde verwondingen: gering
- Anesthesie voor de ingrepen: gering

Cumulatief wordt het risico ingeschat op matig.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Histologie postmortem is het primaire eindpunt van deze proef.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Fok met ongerief</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	2	Fok met ongerief
Volgnummer	Type dierproef					
2	Fok met ongerief					

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit onderzoek kijkt naar verschillende methoden om in te grijpen in het proces van de gewrichtsschade die ontstaat na een bloeding. Tijdens de experimenten wordt gekeken naar het effect van drie interventies (ijzerchelator, IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) op bloed-geïnduceerde artropathie. Om dit onderzoek uit te voeren maken we gebruik van zogenaamde hemofilie A muizen (B6;129S4-F8-tm1Kaz/J). Dit zijn genetische gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno-en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie. De fokpaartjes worden verkregen via het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Deze bijlage omschrijft de opzet voor een fok met ongerief.

---

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.

---

Op basis van de sample size berekening zoals beschreven in bijlage I verwachten we 60 muizen per experiment (2 groepen van 30 dieren) nodig te hebben en in totaal zo'n 360 dieren. Om dit benodigde aantal proefdieren te verkrijgen word er een fok met de B6;129S4-F8-tm1Kaz/J muizen opgezet. Er zal worden gestart met 9 fokouders: 3 mannelijke en 6 vrouwelijke proefdieren.

---

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

---

Gezien de grootte van de groepen en de beperkte capaciteit zullen de beoogde experimenten gefaseerd uitgevoerd worden, waardoor er per experiment de benodigde nakomelingen gefokt worden. Hierdoor hoeven de muizen niet onnodig lang te zitten. De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd. Dit heeft als voordeel dat er per fase wordt gekeken of het voortzetten van het experiment zinvol is, wat onnodig gebruik van proefdieren kan voorkomen.

---

Voor de uitgebreide statistische strategie verwijzen wij u naar bijlage I paragraaf 2A.

---

## **B. De dieren**

---

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

---

Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J) worden verkregen uit het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Dit zijn genetisch gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie en zijn daarmee een uniek model voor het bestuderen van bloedgeïnduceerde artropathie. Voor onze experimenten hebben we in totaal 360 dieren nodig voor in totaal zes experimenten. We zullen de dieren fokken per experiment en het experiment zelf ook gefaseerd uitvoeren met oog op de logistiek.

Er wordt gestart met 9 fokouders: 3 mannelijke dieren en 6 vrouwelijke proefdieren.

Gegevens muis:

- Geslachtsrijp 5 weken
- Fokrijp 8-10 weken
- Draagtijd 19 (18-21) dagen
- Speenleeftijd 21-28 dagen
- Levensverwachting 1-2 jaar
- Gemiddeld 5 nakomelingen per kruising
- Aantal nestjes per vrouwtje: maximaal 2 (om partus gerelateerde problematiek te voorkomen)

Tijdstip	Vrouwen (N)	Mannen (N)	Totaal (N)	Nakomelingen (N)
Start	6	3	9	
Kruising-1				5 x 6 = 30 (15 vrouw, 15 man)
Na kruising-1	21	18	39	
Kruising-2	(12/21)			5 x 12 = 60 (30 vrouw, 30 man)
Na kruising-2	51	48	99	
Verantwoording gebruik dieren				
• Experiment			60	
• Gebruikt huidige fok			18 (♀)	
• Nodige volgende fok			9	
• Uitval 10%			10	
• Surplus			2	

Bovenstaande tabel is een voorbeeld van hoe we het benodigde aantal dieren voor één experiment fokken. Per experiment zal een nieuwe fokopzet gemaakt worden. Voor één experiment worden 18 vrouwtjes gebruikt, voor dit onderzoeksproject in totaal dus 108 fokvrouwen. De fokmannen kunnen deelnemen aan het experiment.

### 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: Proeven *in vitro* vormen een beperkte afspiegeling van de omstandigheden *in vivo* bij zo'n complex proces als het ontstaan van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Bovendien willen we het effect van verschillende methodes bestuderen op het niveau van het gewricht zelf, maar ook in relatie met het lichaam als geheel. Er zijn geen alternatieve modellen voor handen.

Hemofilie in hemofilie A muizen gedraagt zich als hemofilie in de mens, waardoor de dieren uitermate geschikt zijn voor de experimenten. Humane studies op dit onderwerp bij hemofiliepatiënten zijn ethisch niet haalbaar.

Vermindering: Hoewel hemofilie in de mens vrijwel alleen bij mannen voorkomt, gebruiken we voor deze experimenten zowel mannetjes als vrouwtjes omdat het genotype dat toelaat. Daarnaast kunnen de fokmannetjes ook ingezet worden in het experiment zelf. Het gebruik van beide geslachten en de fokmannetjes in het experiment zelf dragen bij aan het verminderen van het fokoverschot en de hoeveelheid dieren.

We berekenen op basis van specifieke sample size berekeningen per experiment het exacte aantal dieren. Bij de berekening wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door spontane of traumagerelateerde bloedingen ingecalculeerd moet worden. De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd. Dit heeft als voordeel dat er per fase wordt gekeken of het voortzetten van het experiment zinvol is, wat onnodig gebruik van proefdieren kan voorkomen. Daarnaast worden de dieren ook per experiment gefokt, zodat de muizen niet onnodig lang zitten.

Verfijning: Er zijn diverse dieren waarin hemofilie spontaan of via genetische modificatie voorkomt. Zo zijn er hond en muismodellen, die bruikbaar zijn voor preklinische studies *in vivo*. Modellen in ratten, schapen en duiven zijn minder uitgewerkt.

Het voordeel van het muismodel is dat hemofiliemuizen, in tegenstelling tot de hond, minder de neiging hebben tot spontaan bloeden in weefsels of gewrichten. Dit geeft een betere controle over de experimentele condities en de fok. Daarnaast is er reeds ruime ervaring met het fokken van deze muizen in onze onderzoeksgroep opgedaan en is geleerd van eerdere welzijnsevaluaties. Een voorbeeld is dat vrouwtjes maximaal 2 nestjes mogen krijgen, omdat er na meerdere nestjes een grotere kans op overlijden leek te zijn. Sinds het instellen van deze maatregel is er geen oversterfte van de fokvrouwen meer voorgekomen.

---

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.

---

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest. Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressie-gerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest. Bij alle dieren wordt er extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerd trauma.

Uit onze ervaring met het fokken van hemofiliemuizen blijkt dat er geen partusgerelateerde uitval ontstaat als vrouwtjes maximaal twee nestjes krijgen. Dit hebben we dan ook opgenomen in ons fokprotocol.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

---

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

---

Nee

---



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

Fokmannen worden solitair gehuisvest. De overige mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest, maar bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressiegerelateerd trauma worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband 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.

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

### **Ongeriefinschatting/humane eindpunten**

#### **H. Pijn en pijnbestrijding**

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er is een hoger risico op wekedelen bloedingen en agressie- en/of trauma gerelateerde bloedingen. Uit onze ervaring blijkt dat er geen partusgerelateerde uitval gezien wordt als vrouwtjes maximaal twee nestjes krijgen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak voor de verhoogde kans op wekedelen bloedingen bij agressie of trauma is de stollingsfactor VIII deficiëntie, ook bij de homozygote vrouwtjes.

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

Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannelijke dieren vanaf de leeftijd van zes weken alleen gehuisvest. Bij alle dieren wordt extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerde bloedingen. Vrouwtjes krijgen maximaal twee nestjes.

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

#### K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief wordt ingeschat als licht.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.II.550.041
2. Titel van het project : Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade
3. Titel van de NTS : Preventie en behandeling van gewrichtsschade na een bloeding

## 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: 05-11-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 18-11-2015 en 16-12-2015  
 anderszins behandeld: per mail: 05-01-2016  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 20-11-2015 tot 30-11-2015  
18-12-2015 tot 04-01-2016  
13-01-2016 tot 15-01-2016  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 24-02-2016

## 7. Eventueel horen van aanvrager

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

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 20-11-2015
- Strekking van de vragen:

Projectvoorstel

- Het gebruik van ijzerchelatoren: Zou u in uw aanvraag een betere en meer inhoudelijke toelichting kunnen geven op de werking van ijzerchelatoren in uw model? Welke bijwerkingen verwacht u? Zijn er klinische aanwijzingen dat het gebruik van ijzerchelatoren bij patiënten met hemofilie helpt of het gewrichtsschadeproces op zijn minst vertraagt? In dit kader vraagt de DEC zich af of dit onderdeel van de studie niet direct in patiënten kan plaatsvinden in plaats van in proefdieren.
- 3.1 Achtergrond: U vermeldt hier alleen de kosten van de bloedstollingsproducten als probleem en niet het feit dat orthopedisch ingrijpen ook geregeld moet worden toegepast. Dit in tegenstelling tot wat u schrijft onder 3.3. Graag aanpassen.
- 3.4.1. De DEC mist de motivatie voor de inductie van een tweede bloeding.
- 3.4.2 Graag de fok hier opnemen als onderdeel D, aangezien de fok een onderdeel is van het project.
- 3.4.3 In figuur 3 staat de term 'on demand' genoemd. Zou het niet beter zijn deze term te vervangen door 'therapeutisch'? Deze suggestie geldt ook voor de rest van de aanvraag.

#### Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters
- Pagina 3. Graag de naam van de biostatisticus verwijderen voordat het naar de CCD gaat. Dit in verband met een mogelijk WOB-verzoek.
- Zijn de concentraties van de toe te dienen stoffen al bekend of moet dit nog uitgezocht worden? Zo ja, heeft dit dan geen consequenties voor de aantallen te gebruiken dieren?
- Op bladzijde 4 van 8 bovenaan staat een uitvalspercentage (tot 20%) genoemd. Op pagina 7 van 8 noemt u een percentage van 10 %. Kunt u deze inconsequentie vermijden?
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: U schrijft: 'Sinds het instellen van deze maatregel is er partusgerelateerde problematiek van fokvoruwen meer voorgekomen.' Ontbreekt hier niet het woord 'geen'?
- K. Classificatie van ongerief: De ongeriefsinschatting 'gering' wordt niet meer gebruikt, dit moet 'licht' zijn, graag wijzigen. Behandeling middels orale toediening moet ingeschaald worden als licht ongerief. Graag aanpassen in de aanvraag.

#### Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen, 2e zin: Achter bloedziekte graag de term hemofilie toevoegen.
- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: De term 'gering' graag vervangen door 'licht'.
- Datum antwoord: 30-11-2015
- Strekking van de antwoorden:

#### Projectvoorstel

- De pathogenese van bloed-geïnduceerde kraakbeen schade is multifactorieel. Door herhaaldelijke bloedingen in het gewricht ontstaat er chronische inflammatie van het synovium en kraakbeenschade. In beide processen speelt ijzer een belangrijke rol. Ijzer heeft een proliferatief effect op het synovium [8] en ijzerrijk synoviaal weefsel produceert meer pro-inflammatoire cytokines (zoals IL-1 $\beta$ , IL-6 en TNF- $\alpha$ ) in vergelijking met normaal synoviaal weefsel [9]. Ijzer uit de erythrocyten kan via de Fenton-reactie zorgen voor de productie van toxische hydroxyl radicalen met apoptose van chondrocyten als gevolg [10]. Het menselijk lichaam is niet in staat zelfstandig ijzer uit te scheiden. Deferasirox is een orale ijzerchelator, die wordt gebruikt bij patiënten met ijzerstapelingsziekten, zoals hemochromatose en transfusie geïnduceerde ijzeroverload. Twee moleculen deferasirox zijn nodig om één ijzermolecuul te binden. Dit complex wordt vervolgens via de feces uitgescheiden [20]. Op deze manier is deferasirox in staat om ijzer aan lichaamsvloeistoffen en weefsels te onttrekken. In eerder dierexperimenteel onderzoek lijkt profylactisch gegeven deferasirox het kraakbeen te beschermen bij hemartrose geïnduceerd in hemofilie muizen [21]. De hypothese is dat schade aan het gewricht vermindert door het onttrekken van ijzer in het geval van een gewrichtsbloeding. Bijwerkingen ijzerchelator: deferasirox wordt systemisch toegepast in de mens. De meest voorkomende bijwerkingen bij de mens zijn stijging van de plasma creatinine en gastro-intestinale klachten. In de eerdere muisstudie met deferasirox werden geen opvallende bijwerkingen zien. Bijwerkingen IL1 $\beta$  en IL4-10 synerkine: deze middelen zullen lokaal worden toegepast (intra-articulair). Hierbij verwachten we geen systemische bijwerkingen. Lokaal kan er een lichte reactie op de intra-articulaire injectie ontstaan.

Er zijn geen klinische studies over het effect van ijzerchelatoren bij hemofiliepatiënten. Het uitvoeren van deze studie in hemofiliepatiënten is niet haalbaar. Allereerst hebben de patiënten stollingsfactoren tot hun beschikking, wat zou interfereren met de studieopzet om het potentiële effect van de ijzerchelator te onderzoeken. Het is niet ethisch om patiënten deze stollingsfactoren te onthouden. Daarnaast is een gewrichtsbloeding in hemofiliepatiënten niet te voorspellen, laat staan in welk gewricht. Daarmee vervalt de optie dat de patiënt zelf zijn eigen controle kan zijn (bijvoorbeeld: aangedane knie vs controle knie). Bovendien is het voor hemofiliepatiënten lastig een gewrichtsbloeding te onderscheiden van een flare-up van hun hemofilie artropathie, wat de afweging om te starten met een ijzerchelator bemoeilijkt. De schade aan het gewricht ontstaat direct bij de eerste bloeding. Niet altijd zijn deze eerste effecten te zien op beeldvorming, al is een MRI wel gevoelig. Histologisch onderzoek is daarom een logische primaire uitkomstmaat. Het is niet ethisch om bij levende patiënten materiaal voor histologisch onderzoek te verkrijgen. Een kraakbeen biopt zou het toch al aangedane gewricht verder verslechteren. Hemofiliemuizen zijn factor VIII deficiënt, maar bloeden niet spontaan (en hebben dus nog geen gewrichtsschade opgelopen). De gewrichtsbloedingen kunnen volgens een vast protocol geïnduceerd worden. Daarnaast krijgen de hemofiliemuizen geen factorconcentraat. Tenslotte is het mogelijk om via histologie postmortem het effect van deferasirox op

weefselniveau in detail te bestuderen, waarbij we gebruik maken van reeds bestaande gevalideerde scores.

- 3.1 Achtergrond: We hebben dit aangepast in 3.1 en 3.3 van het projectvoorstel.
- 3.4.1 Eerdere dierproeven (DEC 2013.II.04.046) door ons uitgevoerd hebben laten zien dat met de dubbele inductie voldoende schade ontstaat om een uitspraak te kunnen doen over het effect van de interventies. Bovendien weerspiegelt dit de humane situatie, waarbij repeterende bloedingen nodig zijn voor de ontwikkeling van hemofilie artropathie.
- 3.4.2 De fok is opgenomen als onderdeel D van het overzicht op hoofdlijnen in 3.4.2 van het projectvoorstel.
- 3.4.3 We hebben de term 'on demand' vervangen door 'therapeutisch' in alle documenten.

#### Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De naam is verwijderd uit bijlage I -A3.
- De concentraties van de stoffen zijn bepaald op basis van in vitro werk of eerder dierexperimenteel werk: deferasirox 30 mg/kg en IL4-10 synerkine 7pmol/3µl i.a.. Mocht er sprake zijn van voortschrijdend inzicht, wordt dit aangepast. De dosering van IL-1B wordt nader bepaald. Het exact te gebruiken aantal dieren zal per experiment worden berekend.
- Deze inconsequentie is aangepast in de aanvraag.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Dat klopt
- K. Classificatie van ongerief: Dat is aangepast

#### Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: Aangepast
- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: Aangepast
  
- Datum: 18-12-2015
- Strekking van de vragen:
  - De DEC dankt u voor uw uitgebreide antwoord. De DEC heeft uit uw antwoord nog niet geheel begrepen of chelatie van ijzer het ontstaan van een anemie bevordert en of controle daarop is meegenomen in de aanvraag. Graag toelichten.
- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.1: Het wordt uit de tekst nog niet duidelijk of er na één inductie onvoldoende schade is, graag duidelijker opschrijven.
  
- Datum antwoord: 04-01-2016
- Strekking van de antwoorden:
  - In de literatuur wordt beschreven dat de ijzerchelator deferasirox een anemie kan verergeren bij reeds bestaande hematologische aandoeningen waarbij het beenmerg is aangedaan. De hemofiliemuizen hebben géén onderliggende hematologische aandoening van dien aard of reeds bestaande anemie, dus lopen hier minder kans op. In een eerdere proof-of-concept studie (DEC 2009.III.08.067) waarbij deferasirox twee maanden aan hemofiliemuizen is

gegeven, zijn plasma ferritine levels bepaald (afgeleide van ijzeropslag in het lichaam). Hierbij is een gemiddeld level van 823 ng/ml  $\pm$ 56 gemeten in de hemofiliegroep (controlegroep 1220 ng/ml  $\pm$ 114). Er zijn geen referentiewaarden bij muizen bekend. Daarom meten we in de komende studies op de momenten dat bloed wordt afgenomen de ijzerparameters en Hb-waarden in het bloed.

- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.1: Eerdere proeven in hemofiliemuizen door onze onderzoeksgroep uitgevoerd, hebben laten zien dat één gewrichtsbloeding zeer geringe gewrichtsschade geeft. Met dubbele inductie wordt er voldoende schade gecreëerd om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over het effect van de interventies (zie ook DEC 2013.II.04.046). Bovendien weerspiegelt dit meer de humane situatie, waarbij repeterende bloedingen nodig zijn voor de ontwikkeling van hemofilie artropathie.
  
- Datum: 13-01-2016
- Strekking van de vraag:
- De DEC is nog niet helemaal tevreden met het antwoord op de vraag of chelatie van ijzer bij muizen met hemophilie kan leiden tot een anaemie en of u daarop controleert. U geeft aan dat u naast het hemoglobinegehalte ook ijzer parameters (welke?) vervolgt, waaronder ferritine. Echter, ferritine is een acuut fase eiwit en het is daarom de vraag of deze wel een goede uitleesparameter is voor het mogelijk ontstaan van anaemie. De DEC adviseert daarom het volume van de erythrocyten en zo mogelijk ook MCH en MCHC als uitleesparameters mee te nemen in uw onderzoek.
  
- Datum antwoord: 15-01-2016
- Strekking van het antwoord:
- Om een eventuele anemie ten gevolge van de ijzerchelatie goed in beeld te brengen, zullen we bij de geplande bloedafnames ook het hemoglobine, MCV en ferritine bepalen. Tevens wordt post-mortem histologisch onderzoek gedaan naar het ijzergehalte in de weefsels (onder andere hart, lever, milt). De literatuur geeft aan dat van alle ijzerparameters ferritine, de afgeleide van ijzeropslag in het lichaam, veruit het meest waardevol voor de diagnostiek is [Guyatt 1992]. Ferritine is inderdaad een acuut-fase eiwit. De bloedafnames zullen echter plaats vinden aan het einde van de studie en op dat moment zijn meerdere weken verstreken sinds het acute moment (de twee gewrichtsbloedingen). Daarom verwachten we geen verstoring van deze bepaling. In een eerdere proof-of-concept studie (DEC 2009.III.08.067) waarbij deferasirox twee maanden aan hemofiliemuizen is gegeven, zijn plasma ferritine levels bepaald. Hierbij is een gemiddeld level van 823 ng/ml  $\pm$ 56 gemeten in de deferasiroxgroep (controlegroep 1220 ng/ml  $\pm$ 114). In beide groepen zijn geen opvallende bijwerkingen gezien. Bovengenoemde labbepalingen zijn overigens niet gestandaardiseerd voor (hemofilie)muizen, dus de vergelijking zal vooral tussen groepen in de studie zinvol zijn. Het observeren van de proefdieren gedurende de proef om op tijd eventueel ongerief te detecteren is het belangrijkste.

- Datum: 11-02-2016
- Strekking van de vragen:
- De DEC stuit bij het afronden van het advies voor de CCD en het opnieuw in detail bestuderen van uw projectaanvraag op enkele punten die nog om verduidelijking vragen. Bijlage 1, punt A, pagina 4: In uw berekening van het benodigde aantal dieren houdt u rekening met 10% uitval. Aangezien uw powerberekening een groeps grootte van 26 dieren oplevert heeft u strikt genomen (26+3=) 29 dieren per groep nodig. U vraagt echter 30 dieren per groep aan. De DEC adviseert u dit aantal aan te passen of nader toe te lichten.
- Bijlage 1, punt D, pagina 5: Hier schrijft u 'Na elke fase wordt aan de hand van de behaalde resultaten beoordeeld of voortzetting van het experiment zinvol is, wat onnodig proefdiergebruik kan voorkomen.' Ook op andere plaatsen in de projectaanvraag komt deze zin terug. De DEC adviseert u helder uiteen te zetten op basis van welke criteria wordt besloten of u wel of niet doorgaat met een experiment.
- Bijlage 2, punt I: Hier schrijft u 'Er is een hoger risico op wekedelen bloedingen en agressie- en/of trauma gerelateerde bloedingen.' Maar bij punt J staat aangegeven dat u niet verwacht dat dieren het humane eindpunt zullen bereiken. De DEC vermoed dat dit een vergissing is, aangezien mannelijke nakomelingen bij tekenen van onderliggen agressie vanaf een leeftijd van 6 weken solitair gehuisvest worden, maar op dat moment al bloedingen t.g.v. vechten opgelopen kunnen hebben. In bijlage 1 geeft u onder punt J namelijk ook aan dat uitval t.g.v. bloedingen na vechten (en ontstekingen na intra- articulaire injecties) te verwachten is. De DEC adviseert u punt J in bijlage 2 aan te passen, of nader toe te lichten waarom u geen uitval verwacht.
- Bijlage 2, pagina 3: Hier schrijft u 'Bij de berekening wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door spontane of traumagerelateerde bloedingen ingecalculeerd moet worden.' Bijlage 2, pagina 5: Ook hier schrijft u: 'Daarbij wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door spontane of traumagerelateerde bloedingen ingecalculeerd moet worden.' De DEC vraagt zich af of het wel juist is om rekening te houden met spontane bloedingen, aangezien het (vaak genoemde) voordeel van dit model juist is dat muizen geen spontane bloedingen vertonen. De DEC adviseert u deze zinnen aan te passen, of nader toe te lichten wat u bedoelt met de spontane bloedingen.
  
- Datum antwoord: 22-02-2016
- Strekking van de antwoorden:
- Bijlage 1, punt A, pagina 4: Dit is aangepast.
- Bijlage 1, punt D, pagina 5: Hiervoor verwijzen we naar het Projectvoorstel, figuur 3 in paragraaf 3.4.3 waarin de samenhang tussen de verschillende projectonderdelen wordt beschreven. Elke interventie kent een preventieve en therapeutische toepassing. Indien op basis van onze primaire uitkomstparameters (de gevalideerde Valentino en Safranin O score) blijkt dat een interventie preventief onvoldoende effect heeft, wordt die tak gestopt en wordt de interventie niet in therapeutische opzet getoetst. De gedachte daarachter is dat als



langere blootstelling aan de interventie (dus nog voor de inductie van gewrichtsschade) geen effect heeft, kortere blootstelling ook niet zinvol is.

- Bijlage 2, punt I: In bijlage 2 is nu beschreven dat ernstige verwondingen / wekedelen bloedingen door agressie of trauma als humaan eindpunt geldt voor de fok.
- Bijlage 2, pagina 3: Deze zinnen zijn aangepast.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

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

### **C. Beoordeling (inhoud):**

#### 1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

#### 2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het onderzoek in de voorliggende projectaanvraag is gericht op nieuwe vormen van behandeling en preventie van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade. Gewrichtsbloedingen kunnen verschillende oorzaken hebben en optreden ten gevolge van bijvoorbeeld trauma, artrose of bloedziekten zoals hemofilie. Herhaaldelijke spontane gewrichtsbloedingen leiden bij hemofiliepatiënten vaak al op jonge leeftijd tot chronische pijn, bewegingsbeperkingen, invaliditeit en verminderde kwaliteit van leven. Een therapie met stollingsfactoren kan het optreden van gewrichtsbloedingen bij deze patiënten niet voorkomen, en een effectieve behandeling van eenmaal ontstane gewrichtsschade is tot op heden niet mogelijk. Uiteindelijk is vaak een gewrichtsvervangende

operatie noodzakelijk. Daarom is er grote behoefte aan nieuwe vormen van preventie en behandeling van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade bij hemofiliepatiënten. De pathogenese van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade is nog niet tot in detail opgehelderd. Wel is bekend dat ijzer en pro-inflammatoire cytokinen daarin een belangrijke rol spelen (zie figuur 2 in de projectaanvraag). Dit wordt bevestigd door recente *in vitro* en *in vivo* experimenten die hebben laten zien dat ijzer en pro-inflammatoire cytokinen veelbelovende aangrijpingspunten vormen voor preventief en therapeutisch ingrijpen. De aanvrager wil met dit project voor een drietal stoffen (een ijzerchelator, een IL1b-receptorantagonist en een IL4-10 synerkine) nader onderzoeken of deze bloedgeïnduceerde gewrichtsschade kunnen voorkomen en/of reduceren. De resultaten van dit project kunnen bijdragen aan verbeterde preventie en behandeling van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade bij hemofiliepatiënten, meer inzicht geven in de pathogenese, en mogelijk nieuwe aangrijpingspunten voor interventies identificeren. De DEC schat het belang in als substantieel.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het project bestaat uit twee logisch met elkaar samenhangende onderdelen. Eerst worden muizen gefokt die een stollingsfactor VIII-deficiëntie hebben (bijlage 2). Deze muizen zijn een erkend geno- en fenotypisch model voor humane hemofilie. Vervolgens worden de muizen gebruikt om de effecten van preventieve en therapeutische interventies op bloedgeïnduceerde gewrichtsschade te onderzoeken (bijlage 2). Doordat de muizen geen spontane gewrichtsbloedingen vertonen – in tegenstelling tot andere dieren die als model voor humane hemofilie in dierexperimenteel onderzoek ingezet worden – kan bij de dieren op gecontroleerde wijze in één knie een bloeding geïnduceerd worden, terwijl de andere knie kan fungeren als controle. Eerst zal worden onderzocht of een preventief toegediende stof bloedgeïnduceerde gewrichtsschade kan voorkomen. Alleen wanneer een interventie in de preventieve setting werkzaam is gebleken zal worden onderzocht of dezelfde stof ook in staat is om na therapeutische toediening reeds ontstane bloedgeïnduceerde gewrichtsschade te reduceren. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Gefokt voor dierproeven (11)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Huisvesting en verzorging
  - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

In verband met verhoogde kans op bloedingen ten gevolge van vechten worden de mannelijke fokdieren uit bijlage 2 solitair gehuisvest. De andere mannelijke dieren uit de bijlagen 1 en 2 worden in principe in groepsverband gehouden, maar bij tekenen van onderlinge agressie ook solitair gehuisvest (vanaf een leeftijd van zes weken).

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor alle dieren in bijlage 2 wordt ingeschat als licht, omdat alle dieren hemofilie hebben en daardoor een verhoogde kans hebben op bloedingen ten gevolge van vechten of ander trauma. Voor de dieren in bijlage 1 wordt het ongerief ten gevolge van hemofilie en experimentele handelingen (zoals het induceren van gewrichtsbloedingen, intra-articulaire injecties, bloedafnamen, en herhaaldelijk bijkomen uit anesthesie) ingeschat als matig. Men houdt er rekening mee dat maximaal 10% van de dieren in bijlage 1 het humane eindpunt bereikt ten gevolge van bloedingen na vechten of door een ontsteking na een intra-articulaire injectie. In bijlage 2 houdt men rekening met een uitval van maximaal 10% ten gevolge van bloedingen na vechten.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De interacties tussen bloed, kraakbeencellen, synovium en immuuncellen die leiden tot bloedgeïnduceerde gewrichtsschade zijn dusdanig complex, dat deze niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden. *In vitro* experimenten zullen wel uitgevoerd worden wanneer de toe te dienen dosering van een stof nog nader bepaald moet worden. In verband met de opzet van het onderzoek (inductie van gewrichtsbloedingen) en de aard van de benodigde gegevens (onder andere histologisch onderzoek van gewrichtskraakbeen) is het niet mogelijk om het onderzoek in gezonde proefpersonen uit te voeren. In de projectaanvraag en de correspondentie met de DEC is door de aanvrager helder uiteengezet waarom het ook niet mogelijk is om het onderzoek in humane hemofiliepatiënten uit te voeren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Met behulp van gegevens uit eerder uitgevoerde experimenten met het beschreven model zullen powerberekeningen worden uitgevoerd, zodat het optimale aantal dieren per groep vooraf bepaald kan worden. Daarbij zal rekening gehouden worden met de maximale te verwachten uitval ten gevolge van bloedingen na vechten. Naar verwachting zal een groepsgrootte van 29 dieren noodzakelijk zijn om betrouwbare uitspraken te kunnen doen over de effecten van de interventies. Omdat het logistiek niet mogelijk is om de experimenten met 292 dieren per interventie- en placebogroep in één keer uit te voeren zullen de experimenten gefaseerd plaatsvinden. Na elke fase wordt aan de hand van de behaalde resultaten beoordeeld of voortzetting van het experiment zinvol is, waardoor onnodig proefdiergebruik voorkomen kan worden. Voor de experimenten van bijlage 1 zullen zowel de mannelijke als de vrouwelijke nakomelingen uit bijlage 2 ingezet worden. Door de fokmannen uit bijlage 2 ook in te zetten

voor de experimenten uit bijlage 1 wordt het aantal benodigde proefdieren verder teruggebracht.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De muizen die in het voorliggende project ingezet worden hebben een stollingsfactor VIII-deficiëntie, met als gevolg een verhoogde kans op bloedingen ten gevolge van trauma. Dit muismodel is een erkend en veelgebruikt model voor humane hemofilie. Het voordeel van muizen ten opzichte van andere dieren die als modeldier voor humane hemofilie ingezet worden is dat ze geen spontane gewrichtsbloedingen vertonen. Daardoor kan de bloeding en daaropvolgende gewrichtsschade op een gecontroleerde manier geïnduceerd worden, en kan de knie waarbij geen bloeding veroorzaakt wordt fungeren als controle. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met dit diersmodel. Zo weet men bijvoorbeeld dat twee achtereenvolgende inducties van een bloeding in het kniegewricht noodzakelijk zijn om een gewrichtsbloeding te bewerkstelligen die voldoende gewrichtsschade tot gevolg heeft en de situatie in de mens zo goed mogelijk benadert. Ook hebben welzijnsevaluaties van eerdere experimenten uitgewezen dat vrouwtjes met hemofilie na het krijgen van twee nesten een aanzienlijk grotere kans hebben om het humane eindpunt te bereiken. Door de vrouwelijke muizen niet vaker dan twee keer in te zetten voor de fok kan de eerder waargenomen partusgerelateerde problematiek in het voorliggende project voorkomen worden. Om ongerief ten gevolge van bloedingen na trauma/vechten zoveel mogelijk te voorkomen wordt extra bedding verstrekt. Op verzoek van de DEC gaat de onderzoeksgroep zowel tijdens het experiment als post mortem bepalen of de toediening van de ijzerchelator niet toch tegen de verwachtingen in een anemie induceert (voor details verwijst de DEC graag naar de correspondentie onder A8). De dieren uit bijlage 2 zullen per gepland experiment van bijlage 1 gefokt worden, zodat de muizen niet onnodig lang in voorraad moeten zitten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

#### **D. Ethische afweging**

Op grond van de onder C genoemde overwegingen is de DEC van mening dat het belang van de doelstelling – het onderzoeken van de preventieve en therapeutische effecten van verschillende interventies op het ontstaan van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade – substantieel is. Het projectvoorstel is vanuit wetenschappelijk oogpunt verantwoord. Translatie van onderzoeksresultaten naar de mens wordt mogelijk geacht, omdat men gebruik maakt van een erkend model voor humane hemofilie en bloedgeïnduceerde gewrichtsschade. De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat het diersmodel en de verschillende experimenten noodzakelijk zijn voor het bereiken van de doelstelling. De DEC is ervan overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven, onder andere omdat de onderzoeksgroep

veel ervaring heeft met het model, de experimenten gefaseerd worden uitgevoerd, en de interventies pas in een therapeutische setting worden onderzocht wanneer hun werkzaamheid in een preventieve setting is aangetoond. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van het voorliggende onderzoek opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren zullen ondervinden, en dat het gebruik van de dieren voor dit project ethisch aanvaardbaar is.

### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op

### **Dierexperimentencommissie Utrecht**



> 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  
AVD115002016451

**Bijlagen**

2

Datum 26 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016451. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 april 2016  
Geplande einddatum: 1 april 2021  
Titel project: Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade  
Titel niet-technische samenvatting: Preventie en behandeling van gewrichtsschade na een bloeding  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec.utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

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

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam:   
Functie:   
Plaats: Utrecht  
Datum: 23 februari 2016

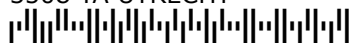


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 80011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002016451

**Bijlagen**

2

Datum 26 februari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 26 februari 2016

Vervaldatum: 27 maart 2016

Factuurnummer: 16700451

Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002016451	€ 741,00

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

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 23 maart 2016 14:53  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: aanvraag AVD115002016451  
**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Geachte mevrouw [REDACTED]

Na overleg met de onderzoeker blijkt dat er vanuit de IvD een verouderde versie naar u is verzonden. Hiervoor excuses. Een recente versie is via de beveiligde verbinding naar u verzonden.

Hopelijk kan de beoordeling van deze projectaanvraag snel doorgang vinden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED] • *Secretaresse* • [REDACTED] • [REDACTED] • kamer [REDACTED]  
 • [REDACTED]  
 [REDACTED] • [REDACTED] • aanwezig ma, di, wo, vr

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** woensdag 23 maart 2016 13:50  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** [REDACTED]  
**Subject:** aanvraag AVD115002016451

Geachte [REDACTED]

U heeft een aanvraag voor projectvergunning gedaan bij de CCD. het betreft uw project 'Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade' met aanvraagnummer AVD115002016451. Wanneer wij de ingediende aanvraag naast het DEC advies leggen, wordt duidelijk dat niet alle door de DEC voorgestelde veranderingen zijn doorgevoerd. Onder anderen is de term "on demand" niet vervangen voor therapeutisch in de documenten, ook staat in bijlage 3.4.4.1 de naam van de biostatisticus nog genoemd. Wij willen u vragen te controleren of de juiste versie van de formulieren bij de aanvraag is gevoegd,

Wanneer wij de juiste versie van de formulieren die zijn aangepast na correspondentie met de DEC hebben ontvangen nemen wij uw aanvraag verder in behandeling,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

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





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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

Gewrichtsbloedingen kunnen ontstaan als gevolg van trauma [1] of operatie [2], maar worden ook gezien in het kader van artrose [3], pigmented villonodular synovitis [4] of ziekten met een verhoogde bloedingsneiging zoals hemofilie [5]. Ongeacht de oorzaak, veroorzaakt recidiverende hemartrose kraakbeenschade en chronische inflammatie van het synovium en resulteert uiteindelijk in bloed-geïnduceerde artropathie [6]. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat onder andere ijzer, dat bij een bloeding intra-articulair vrijkomt uit erythrocyten, daarbij een cruciale rol speelt [7]. IJzer heeft een proliferatief effect op het synovium [8] en ijzerrijk synoviaal weefsel produceert meer pro-inflammatoire cytokines (zoals IL-1 $\beta$ , IL-6 en TNF- $\alpha$ ) in vergelijking met normaal synoviaal weefsel [9]. IJzer uit de erythrocyten kan via de Fenton-reactie zorgen voor de productie van toxische hydroxyl radicalen met apoptose van chondrocyten als gevolg [10].

Hemofilie wordt beschouwd als de prototypische ziekte die model staat voor de pathobiologie van bloed-geïnduceerde artropathie [11]. Hemofilie is een erfelijke X-linked recessieve stollingsfactordeficiëntie van factor VIII (Hemofilie A) en IX (Hemofilie B) [12]. Patiënten met ernstige hemofilie (FVIII/IX < 1%) krijgen frequent spontane gewrichtsbloedingen, waarbij de knieën, ellebogen en enkels het vaakst zijn aangedaan [13]. Patiënten ervaren chronische pijn, bewegingsbeperkingen, invaliditeit en een verminderde kwaliteit van leven, vaak al op een zeer jonge leeftijd (minder dan 30 jaar) [14]. Uiteindelijk is vaak orthopedisch ingrijpen noodzakelijk [15,16]. Chirurgische procedures worden echter bemoeilijkt door de verminderde hemostase en zijn bovendien erg kostbaar.

Met stollingsfactorconcentraat kan het aantal gewrichtsbloedingen bij hemofiliepatiënten worden gereduceerd, maar niet geheel voorkomen worden [17]. Daarnaast is stollingsfactor-concentraat slechts in een beperkt aantal landen beschikbaar vanwege de hoge kosten. Wereldwijd heeft de meerderheid van de hemofiliepatiënten geen toegang tot deze behandeling. Verder ontwikkelt 1/3 van de hemofiliepatiënten antistoffen tegen het stollingsfactorconcentraat (remmers) [18]. Voor deze patiëntengroep is geactiveerd prothrombine complex concentraat of recombinant factor VIIa beschikbaar, maar deze behandeling is duur en minder effectief waardoor er evengoed herhaaldelijke gewrichtsbloedingen kunnen ontstaan [19]. Daarom zijn nieuwe vormen van therapie voor bloed-geïnduceerde gewrichtsschade noodzakelijk.

De afgelopen jaren is door onze groep kennis vergaard over de pathogenese van gewrichtsbloedingen en zijn de eerste stappen naar mogelijke nieuwe behandelingen bestudeerd. Een aantal voorbeelden hier van zijn:

- A) Deferasirox is een orale ijzerchelator, die wordt gebruikt bij patiënten met ijzerstapelingsziekten. Het menselijk lichaam is niet in staat zelfstandig ijzer uit te scheiden. Twee moleculen deferasirox zijn nodig om één ijzermolecuul te binden. Dit complex wordt vervolgens via de feces uitgescheiden [20]. Op deze manier is deferasirox in staat om ijzer aan lichaamsvloeistoffen en weefsels te onttrekken. In eerder dierexperimenteel onderzoek lijkt profylactisch gegeven deferasirox het kraakbeen te beschermen bij hemartrose geïnduceerd in hemofilie muizen [21]. De hypothese is dat schade aan het gewricht vermindert door het onttrekken van ijzer in het geval van een gewrichtsbloeding.
- B) Van interleukine-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) is aangetoond dat het een cruciale factor is in de ontwikkeling van bloed-geïnduceerde kraakbeenschade *in vitro*. Het

- blokken van deze pro-inflammatoire cytokine met een monoklonaal antilichaam beschermt het kraakbeen tegen schadelijke effecten bij blootstelling aan bloed [22]. Het remmen van de productie van IL1b zou dus ook *in vivo* een behandelingsoptie kunnen zijn.
- C) Het IL4-10 synerkine is een fusie-eiwit bestaande uit IL-4 en IL-10. Van IL-4 en IL-10 is bekend dat ze de productie van pro-inflammatoire cytokines die vrijkomen bij een gewrichtsbloeding, zoals IL-1 $\beta$ , IL-6 en TNF- $\alpha$ , remmen [23]. Een combinatie van IL-4 en IL-10 *in vitro* voorkomt gewrichtsschade na een geïnduceerde bloeding [24] en zou daarmee ook *in vivo* een behandelingsmodaliteit kunnen zijn.

Hoewel de benoemde opties hoopvol zijn, is verder onderzoek naar de verschillende interventies die gewrichtsschade na een bloeding kunnen voorkomen of reduceren nodig om de translatie naar humane kliniek te kunnen maken. Om de pathogenese beter te begrijpen en eventueel nieuwe behandelingsdoelstellingen te ontdekken, is er meer kennis nodig over het effect van de interventies op (systemische) inflammatie en kraakbeenschade na een bloeding. Om dit verder te kunnen onderzoeken zijn er diverse experimenten nodig in een diermodel voor bloed-geïnduceerde gewrichtsschade, in zogenaamde hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J). Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor humane hemofilie.

### 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 doelstelling van dit onderzoeksproject is het verkrijgen van inzicht in de pathogenese van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Daarnaast wordt het effect onderzocht van verschillende interventies gericht op het voorkomen of behandelen van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Deze interventies zijn: ijzerchelatoren, IL1b-receptorantagonisten en IL4-10 synerkine. Translatie naar een betere behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade en het verminderen van de daarmee samenhangende morbiditeit in de kliniek staat hierbij voorop.

### 3.3 Belang

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

Ongeacht de oorzaak van de gewrichtsbloeding en, leidt bloed-geïnduceerde artropathie tot ernstige morbiditeit. Bij hemofiliepatiënten is het één van de meest voorkomende complicaties en heeft grote gevolgen. Ondanks het gebruik van stollingsfactorconcentraat komen gewrichtsbloedingen nog steeds voor (zie 3.1). Patiënten met bloed-geïnduceerde artropathie ervaren chronische pijn, bewegingsbeperkingen, invaliditeit en een verminderde kwaliteit van leven, vaak al op een zeer jonge leeftijd (minder dan 30 jaar) [14]. Uiteindelijk is vaak orthopedisch ingrijpen noodzakelijk [15,16]. Chirurgische procedures worden echter bemoeilijkt door de verminderde hemostase en zijn bovendien erg kostbaar. Derhalve is het nodig om nieuwe behandelingen van bloed-geïnduceerde artropathie te onderzoeken.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

#### Algemene opzet

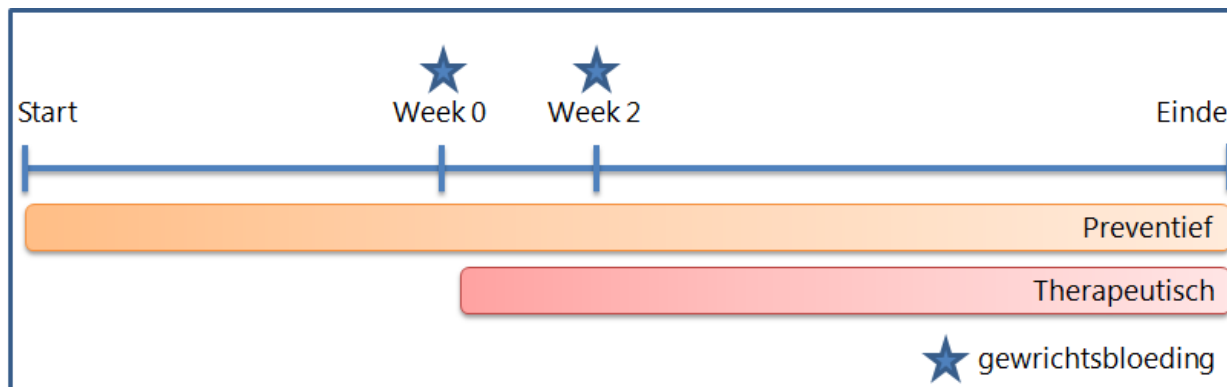
De verschillende interventies van dit project weerspiegelen verschillende mechanismen om in te grijpen in het proces van de bloed-geïnduceerde gewrichtsschade (zie figuur 2 bij 3.4.3). Per interventie zoals beschreven in 3.1 zullen een aantal experimenten worden opgezet. Bij die experimenten wordt de interventie eerst ingezet als preventieve maatregel en bij succes in therapeutische opzet getoetst. Hierbij zal er tevens een brede analyse naar de lokale en systemische effecten plaats vinden.

### Model

Hemartrose wordt geïnduceerd in zogenaamde hemofilie muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J), naar het muismodel van Hakobyan [11]. Er is gekozen voor deze vorm van trauma gezien het relatief beperkte ongerief voor het dier en de opgedane ervaring binnen onze onderzoeksgroep. Hemofiliemuizen vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie. De hemofilie muizen, die drie tot vier maanden oud zijn, worden geanestheseerd middels inhalatie anesthesie. Met een 30G naald wordt het kapsel van de rechter knie onder de patella gepuncteerd om een bloeding te induceren. De linker knie wordt niet aangedaan en geldt als een controle. Na twee weken wordt via dezelfde methode een tweede bloeding geïnduceerd.

Eerdere proeven in hemofiliemuizen door onze onderzoeksgroep uitgevoerd, hebben laten zien dat één gewrichtsbloeding zeer geringe gewrichtsschade geeft. Met dubbele inductie wordt er voldoende schade gecreëerd om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over het effect van de interventies (zie ook DEC 2013.II.04.046). Bovendien weerspiegelt dit meer de humane situatie, waarbij repeterende bloedingen nodig zijn voor de ontwikkeling van hemofilie artropathie.

In het geval dat de interventie preventief gegeven wordt, krijgen hemofiliemuizen de medicatie al *voor* de inductie van de gewrichtsbloeding. Eventueel wordt de interventie na de gewrichtsbloeding voor een bepaalde tijd voortgezet. In het geval dat de interventie therapeutisch wordt gegeven, wordt de interventie pas gestart *na* het induceren van de gewrichtsbloeding.



Figuur 1 – Tijdslijn experimenten Preventief en Therapeutisch

### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameter is histologie post mortem, waarbij de mate van kraakbeenschade en inflammatie van het synovium vastgesteld worden. Hiervoor worden de gevalideerde Valentino score [26] en Safranin O score [27] gebruikt. Secundaire uitkomstparameter is macroscopische inspectie, waarbij gekeken wordt naar de mate van zichtbare bloeding en gewrichtsdiameter. Tevens wordt bloed afgenomen middels een wangpunctie, waarbij verschillende inflammatoire parameters, biomarkers, genotype en ijzerstatus bepaald worden. Ook wordt bij de ijzerchelatie experimenten post-mortem histologisch onderzoek gedaan naar het ijzergehalte in de weefsels (onder andere hart, lever, milt).

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

De verschillende onderdelen van het project:

A) Interventie: ijzerchelator



- Preventief (behandelen met ijzerchelator alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
- Therapeutisch (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas ijzerchelator toegediend wordt)

B) Interventie: IL1b-receptor antagonist

- Preventief (behandelen met IL1b-receptor antagonist alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
- Therapeutisch (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas IL1b-receptor antagonist toegediend wordt)

C) Interventie: IL4-10 synerkine

- Preventief (behandelen met IL4-10 synerkine alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
- Therapeutisch (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas IL4-10 synerkine toegediend wordt)

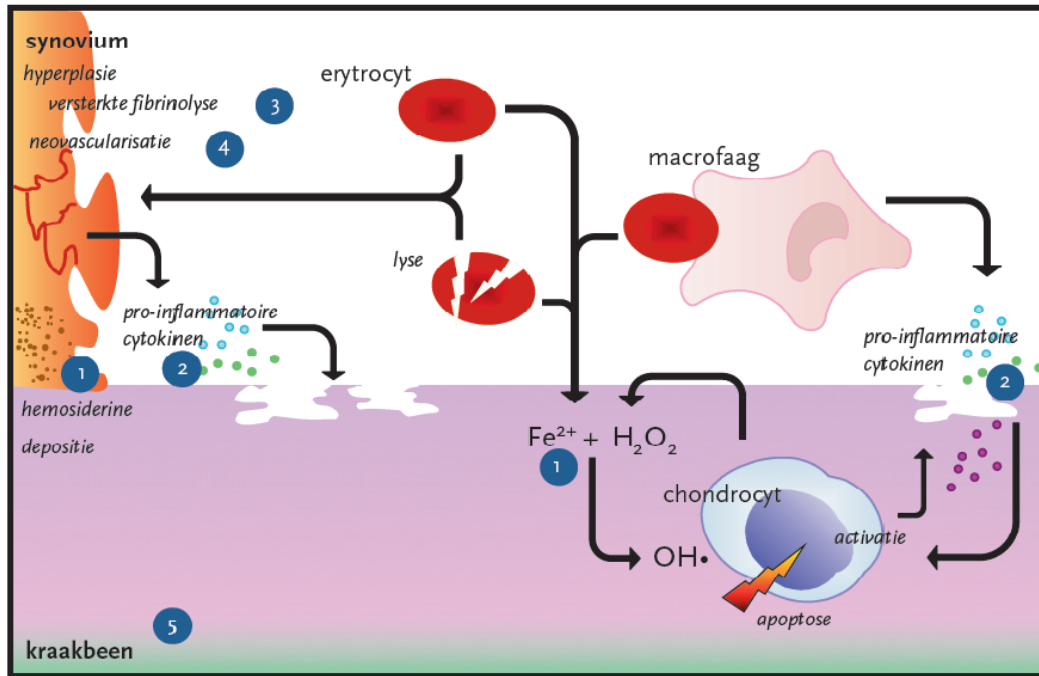
D) Fok met ongerief – hemofilie muizen

---

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

---

De pathogenese van bloed-geïnduceerde artropathie is complex. Op verschillende niveaus zou op dit proces ingegrepen kunnen worden. In onderstaand figuur [25] staat de pathogenese van bloed-geïnduceerde artropathie beschreven met mogelijke aangrijpingspunten voor potentiële nieuwe therapie. Vertaald naar onze studie grijpt interventie A (ijzerchelator) aan op nummer 1 en interventie B en C (IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) remmen de pro-inflammatoire cytokines van nummer 2.

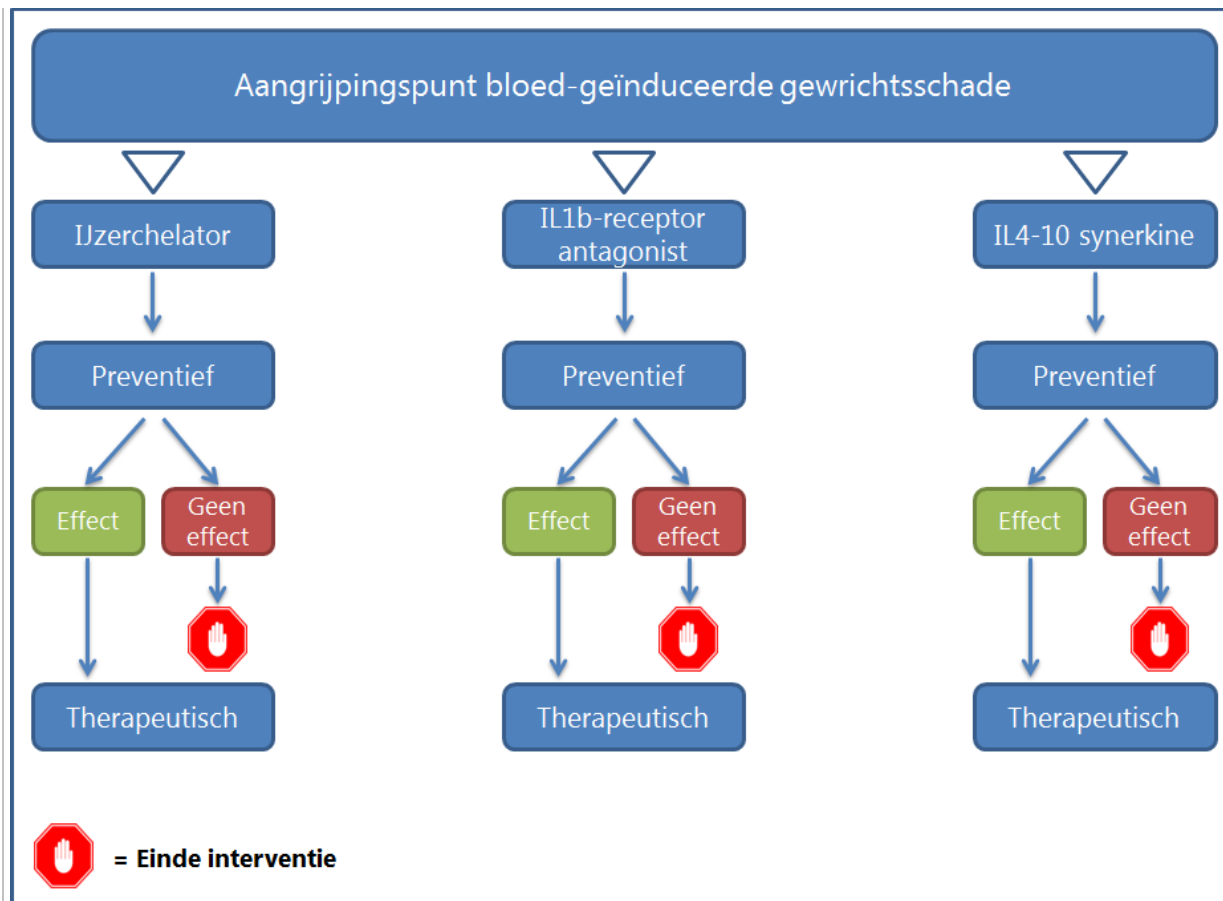


Figuur 2 - Pathogenese van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade en aangrijpingspunten voor potentiële nieuwe therapieën.

1: ijzerchelatie; 2: anti-inflammatoire therapie (IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine); 3: fibrinolysereimmers; 4: neoangiogeneseremmers; 5: kraakbeenregeneratie

Ons onderzoeksproject richt zich op ijzerchelatie en twee vormen van anti-inflammatoire therapie. In figuur 3 is de samenhang van de verschillende onderdelen van het project weergegeven. De experimenten die horen bij interventie A t/m C kunnen onafhankelijk van elkaar worden uitgevoerd. Allereerst wordt gekeken of de interventie effect heeft als het preventief gegeven wordt en daarmee bloedgeïnduceerde schade voorkomt (op basis van onze primaire uitkomstparameter, zie 3.4.1). Indien blijkt dat een interventie preventief onvoldoende effect heeft, wordt die tak gestopt en wordt de interventie in therapeutische opzet achterwege gelaten. De hypothese is dat als lange blootstelling aan de interventie (dus nog voor de inductie van gewrichtsschade) geen effect heeft, kortere blootstelling niet zinvol is. Bij een positieve bevinding wordt wel therapeutische toediening getoetst.

De beperkte beschikbare capaciteit maakt dat we moeten kiezen met welke interventie we beginnen. Als eerste willen we de effecten van ijzerchelatie bestuderen, mede omdat dit middel al klinisch wordt toegepast bij ziektebeelden als hemochromatose en ijzerstapeling door herhaalde bloedtransfusie. Bij succes kan dit de translatie naar de humane kliniek bevorderen. Indien ijzerchelatie niet het gewenste resultaat oplevert, switchen we naar een andere tak/interventie binnen dit project.



Figuur 3 – samenhang projectonderdelen

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Muismodel – Experimenten
2	Muismodel – Fok met ongerief
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 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="1"/> | <input type="text" value="Muismodel - Experimenten"/> |

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

###### Experimentele aanpak

Dit onderzoek kijkt naar verschillende methoden om in te grijpen in het proces van de schade die ontstaat na een gewrichtsbloeding. Tijdens de experimenten wordt gekeken naar het effect van de interventies (ijzerchelator, IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) op bloed-geïnduceerde artropathie. Bij de experimenten wordt de interventie eerst ingezet als preventieve maatregel, om vervolgens bij succes therapeutisch te worden getoetst. Hierbij zal tevens een brede analyse naar de lokale en systemische effecten plaats vinden.

### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameter is histologie post-mortem, waarbij de mate van kraakbeenschade en inflammatie van het synovium vastgesteld wordt. Hiervoor worden de gevalideerde Valentino score [26] en Safranin O score [27] gebruikt. De resultaten worden blind beoordeeld door twee onderzoekers. Secundaire uitkomstparameter is macroscopische inspectie, waarbij gekeken wordt naar de mate van zichtbare bloeding en de gewrichtsdiameter. Tevens wordt bloed afgenomen middels een wangpunctie, waarbij verschillende inflammatoire parameters, biomarkers, genotype en ijzerstatus bepaald worden. Ook wordt bij de ijzerchelatie experimenten post-mortem histologisch onderzoek gedaan naar het ijzergehalte in de weefsels (onder andere hart, lever, milt).

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.

### Behandelingsduur

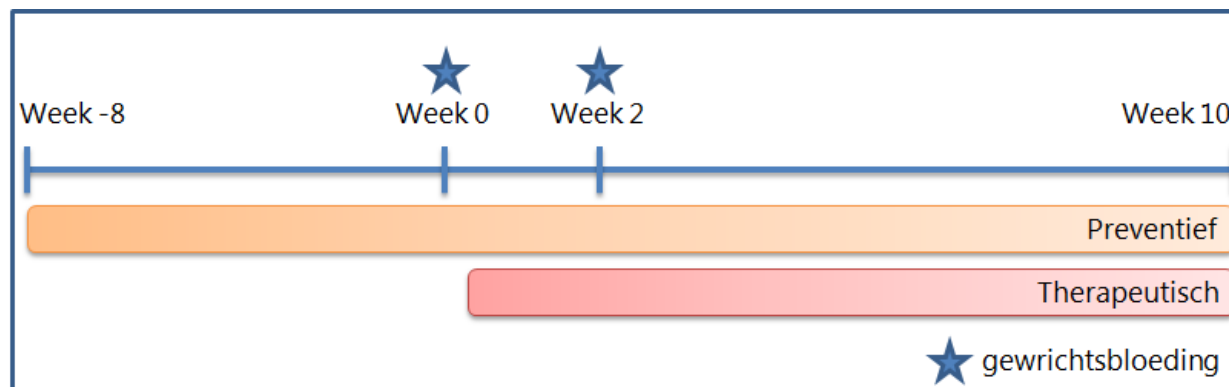
#### *Preventief*

Bij deze experimenten worden de hemofiliemuizen gerandomiseerd tussen de interventie of placebo. De muizen worden behandeld met de interventie tot maximaal 8 weken voor het induceren van de gewrichtsbloeding. In week 0 en week 2 wordt een gewrichtsbloeding geïnduceerd. De behandeling wordt gecontinueerd voor een periode van 10 weken na het induceren van de gewrichtsbloeding. De maximale duur van follow-up in het experiment kan variëren op basis van voortschrijdend inzicht (zowel korter als langer) en wordt specifiek gedefinieerd per experiment.

#### *Therapeutisch*

De hemofiliemuizen worden gerandomiseerd tussen de interventie of placebo. Er worden gewrichtsbloedingen geïnduceerd, waarna op een later moment gestart wordt met de interventie. Deze behandeling wordt voor een periode van 10 weken voortgezet. De frequentie van behandeling en maximale duur van follow-up in het experiment kan variëren op basis van voortschrijdend inzicht (zowel korter als langer) en zal per experiment worden gedefinieerd.

Bovenstaande opzet wordt verduidelijkt in figuur 1.



Figuur 1 – Tijdslijn experimenten Preventie en Therapeutisch

## Behandeling

De verschillende interventies worden op verschillende wijze toegediend. De ijzerchelator deferasirox wordt opgelost in het drinkwater ('placebo': drinkwater zonder toevoeging) in een dosering van 30 mg/kg (op basis van eerdere muisstudie [21], mocht er sprake zijn van voortschrijdend inzicht wordt dit aangepast). Deferasirox wordt systemisch toegepast in de mens. De meest voorkomende bijwerkingen bij de mens zijn stijging van de plasma creatinine en gastro-intestinale klachten. In de literatuur wordt beschreven dat de ijzerchelator deferasirox een anemie kan verergeren bij reeds bestaande hematologische aandoeningen. De hemofiliemuizen hebben geen onderliggende hematologische aandoening of reeds bestaande anemie, dus lopen hier minder kans op. Om een eventuele anemie ten gevolge van de ijzerchelatie goed in beeld te brengen, zullen we bij de geplande bloedafnames ook het hemoglobine, MCV en ferritine bepalen [28]. Tevens wordt post-mortem histologisch onderzoek gedaan naar het ijzergehalte in de weefsels (onder andere hart, lever, milt). Hoewel ferritine een acuut-fase eiwit is, verwachten we geen verstoring van de bepaling omdat de bloedafnames meerdere weken na het 'acute moment' (de gewrichtsbloedingen) zullen plaatsvinden. In een eerdere proof-of-concept studie (DEC 2009.III.08.067) waarbij deferasirox twee maanden aan hemofiliemuizen is gegeven, zijn plasma ferritine levels bepaald. Hierbij is een gemiddeld level van 823 ng/ml  $\pm$ 56 gemeten in de deferasiroxgroep (controlegroep 1220 ng/ml  $\pm$ 114). In beide groepen zijn geen opvallende bijwerkingen gezien.

IL4-10 synerkine en IL1b-receptor antagonist worden intra-articulair gegeven (placebo: intra-articulaire injectie met alleen oplosmiddel). De voorgestelde dosering IL4-10 synerkine is 7pmol/3 $\mu$ l. Mocht er sprake zijn van voortschrijdend inzicht, wordt dit aangepast. De dosering van IL1b wordt nader bepaald op basis van *in vitro* werk / literatuuronderzoek. Bij deze middelen verwachten we geen systemische bijwerkingen. Lokaal kan er een lichte reactie op de intra-articulaire injectie ontstaan.

Hemofilie muizen krijgen, in tegenstelling tot de humane situatie, geen spontane gewrichtsbloedingen. Daarom worden op een gecontroleerde manier gewrichtsbloedingen geïnduceerd naar het muismodel van Hakobyan [11]. De hemofiliemuizen worden verdoofd middels inhalatie anesthesie. Met een 30G naald wordt het kapsel van de rechter knie onder de patella gepuncteerd om een bloeding te induceren. De linker knie wordt niet aangedaan en geldt als een controle. Voor de ontwikkeling van hemofilie artropathie zijn repeterende bloedingen nodig. Om zeker te weten dat het gewricht voldoende blootgesteld is aan bloed, wordt na twee weken via dezelfde methode een tweede kniebloeding geïnduceerd. De muizen worden gedood door cervicale dislocatie.

Er is gekozen voor dit muismodel vanwege het relatief beperkte ongerief voor het dier en omdat eerder wetenschappelijk onderzoek gebruik maakte van dit model waardoor resultaten te vergelijken zijn. Bovendien is er ruime ervaring mee opgedaan binnen onze onderzoeksgroep.

---

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

Onze primaire outcome is de Valentino score, een gevalideerde histologische score voor de mate van gewrichtsschade ten gevolge van bloed. Deze score is een categorische score van 0 tot 10. Deze score zal door 2 personen worden uitgevoerd, wat de mogelijkheid geeft tot maximaal 20 categorische variabelen. In overleg met onze biostatisticus, eveneens verbonden aan het Julius centrum Utrecht, is een algemene vuistregel dat een categorische score van meer dan 5 punten als een continue variabele mag worden beschouwd. Mede op basis van deze vuistregel en onderstaande aannames, die onder andere gebaseerd zijn op onze vorige experimenten met dit model, komen we uit op de volgende algemene sample-size berekening:

Op basis van eerder gedane experimenten is de verwachting dat een minimale effect-size van 0.8 (groot; effect size tussen behandelde poot versus placebo behandelde poot) als klinisch relevant gezien kan worden. Op basis van een alpha van 0.05, een power van 0.8 waarbij 2 onafhankelijke groepen vergeleken worden op 1 primaire outcome, is de verwachting dat groepen van 26 dieren nodig zijn per experiment om een relevant verschil aan te kunnen tonen (berekend met G-power).

**t tests** - Means: Difference between two independent means (two groups)

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

**Input:**

Tail(s)	=	Two
Effect size d	=	0.8
$\alpha$ err prob	=	0.05
Power (1- $\beta$ err prob)	=	0.8
Allocation ratio N2/N1	=	1

**Output:**

Noncentrality parameter $\delta$	=	2.8844410
Critical t	=	2.0085591
Df	=	50
Sample size group 1	=	26
Sample size group 2	=	26
Total sample size	=	52
Actual power	=	0.8074866.

Op basis van vorige experimenten verwachten we een uitval van 10%. Daarmee is de verwachting dat we groepen van 29 dieren nodig hebben. Het gehele project is te groot om logistiek te kunnen hanteren, dus zullen de experimenten gefaseerd worden uitgevoerd en zal per fase bekeken worden of voortzetting van het experiment zinvol is (zie projectvoorstel 3.4.3). Voor de precieze aantallen zal er per experiment een sample size analyse uitgevoerd worden.

## B. De dieren

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

Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J) worden verkregen uit het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Dit zijn genetisch gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie en zijn daarmee een uniek model voor het bestuderen van bloed-geïnduceerde artropathie. De muizen vertonen geen spontane bloedingen (en hebben dus nog geen gewrichtsschade opgelopen), waardoor het model zich leent voor het controleerbaar induceren van gewrichtsbloedingen. Voor de experimenten worden dieren gebruikt tussen de 3 en 4 maanden oud en zowel mannetjes als vrouwtjes kunnen worden ingezet.

De dieren worden gefokt in het Gemeenschappelijk Dieren Laboratorium (GDL) van de Universiteit Utrecht. Hieronder volgt de uitleg over de benodigde aantallen.

*Experimenten:* Per interventie worden er twee type experimenten gedaan (preventief en therapeutisch). Elk type experiment vereist twee groepen: een interventie en placebo groep. De verwachting is dat er per groep 29 dieren nodig zijn. Daarmee komt het verwachte aantal op 348 dieren (3 interventies x 2 type experimenten x 2 groepen per experiment x 29 = 348 dieren).

*Fok:* De dieren worden per experiment gefokt. Voor één experiment zijn 58 dieren nodig en daarvoor worden 18 fokpaartjes gebruikt. De fokmannen worden ingezet in het experiment en zijn verdisconteerd in de bovenstaande 348 dieren. Blijven over de fokvrouwtjes = 3 interventies x 2 type experimenten x 18 = 108 dieren (zie bijlage II 2.B.).

*Totaal:* Het totale aantal komt op 348 + 108 = 456 dieren.



De motivatie voor de inzet van proefdieren ligt in het feit dat *in vitro* experimenten een beperkte afspiegeling vormen van de *in vivo* situatie bij zo'n complexe pathogenese als bloed-geïnduceerde artropathie. Er zijn geen alternatieven voor handen. Humane studies bij hemofiliepatiënten naar dit onderwerp zijn ethisch en technisch niet haalbaar (zie D).

### 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: Proeven *in vitro* vormen een beperkte afspiegeling van de omstandigheden *in vivo* bij zo'n complex proces als het ontstaan van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Bovendien willen we het effect van verschillende methodes bestuderen op het niveau van het gewricht zelf, maar ook in relatie met het lichaam als geheel. Er zijn geen alternatieve modellen voor handen (search: Pubmed, Go3R). Hemofilie in hemofilie A muizen gedraagt zich als hemofilie in de mens, waardoor de dieren uitermate geschikt zijn voor de experimenten. Humane studies op dit onderwerp bij hemofiliepatiënten zijn ethisch niet haalbaar. Allereerst hebben hemofiliepatiënten stollingsfactoren tot hun beschikking, wat interfereert met de studieopzet om het potentiële effect van de interventies te onderzoeken. Het is niet ethisch om patiënten deze stollingsfactoren te onthouden. Daarnaast is een gewrichtsbloeding in hemofiliepatiënten niet te voorspellen, laat staan in welk gewricht. Daarmee vervalt de optie dat de patiënt zelf zijn eigen controle kan zijn. Bovendien is het voor hemofiliepatiënten lastig een gewrichtsbloeding te onderscheiden van een flare-up van hun hemofilie artropathie, wat de afweging om te starten met de interventie bemoeilijkt.

Om het effect van de interventie op weefselniveau in detail te kunnen onderzoeken, is histologisch onderzoek de primaire uitkomstmaat. Het is niet ethisch om bij levende patiënten materiaal voor histologisch onderzoek te verkrijgen. Een kraakbeen biopt zou het toch al aangedane gewricht verder verslechteren.

Vermindering: Hoewel hemofilie in de mens vrijwel alleen bij mannen voorkomt, gebruiken we voor deze experimenten zowel mannetjes als vrouwtjes omdat het genotype dat toelaat. Het gebruik van beide geslachten draagt bij aan het verminderen van het fokoverschot.

Op basis specifieke sample size berekeningen zal per experiment het exacte aantal dieren berekend worden. De verwachting is dat 29 dieren per groep nodig zijn om met voldoende zekerheid een uitspraak te kunnen doen over een specifieke interventie. Daarbij wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door traumagerelateerde bloedingen ingecalculeerd moet worden. Het gehele project is te groot om logistiek te kunnen hanteren, dus zullen de experimenten gefaseerd worden uitgevoerd en zal per fase bekeken worden of voortzetting van het experiment zinvol is (zie

projectvoorstel 3.4.3).

*In vitro* experimenten en/of literatuur studie vormen de basis van de doseringen die gebruikt worden in de experimenten, zodat we zo gericht mogelijke dosering kunnen toepassen. Deze voorstudies zorgen er dus voor dat het aantal dieren kan worden verminderd.

Verfijning: Er zijn diverse dieren waarin hemofilie spontaan of via genetische modificatie voorkomt. Zo zijn er hond en muismodellen, die bruikbaar zijn voor preklinische studies *in vivo*. Modellen in ratten, schapen en duiven zijn minder uitgewerkt.

Het voordeel van het muismodel is dat hemofiliemuizen, in tegenstelling tot de hond, minder de neiging hebben tot spontaan bloeden in weefsels of gewrichten. Dit geeft een betere controle over de experimentele condities. Verder is er eerder wetenschappelijk onderzoek in deze hemofiliemuizen gedaan, waardoor het vergelijken van resultaten gemakkelijker is. Daarnaast is er reeds ruime ervaring met dit muismodel in onze onderzoeksgroep opgedaan en is geleerd van eerdere welzijnsevaluaties. Een voorbeeld is dat vrouwtjes maximaal 2 nestjes mogen krijgen, omdat er na meerdere nestjes een grotere kans op overlijden leek te zijn. Sinds het instellen van deze maatregel is er geen partusgerelateerde problematiek van fokvrouwen meer voorgekomen.

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.

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest. Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressie-gerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest. Bij alle dieren wordt er extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerd trauma.

De dieren worden verdoofd voor het induceren van de gewrichtsbloeding en het inspecteren van het gewricht.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest, maar bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressiegerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband 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.

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De dieren worden geanestheseerd voorafgaand aan de handelingen als inspectie van de gewrichtsdiameter, bloedafname en gewrichtspuncties. In eerdere experimenten van onze groep is de mate van ongerief na een gewrichtspunctie zeer gering gebleken, derhalve wordt geen additionele pijnstilling gegeven.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Ten gevolge van het genotype kans op wekedelen bloedingen; agressie- en/of traumagerelateerde bloedingen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak ligt in het genotype van de muis; de stollingsfactor VIII deficiëntie.

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

Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannelijke dieren vanaf de leeftijd van zes weken alleen gehuisvest. Bij alle dieren wordt extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerde bloedingen.

### 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 specifiek voor deze studie:

- Ernstige verwondingen / wekeden bloedingen door agressie of trauma (Hemofiliemuizen bloeden in principe niet spontaan).
- Intra-articulaire ontsteking ten gevolge van lokale behandeling bij interventie arm B en C (kans hier op klein maar mogelijk).

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

Op basis van welzijnsevaluatie 2012 en eerdere ervaringen: 10%.

### **K. Classificatie van ongerief**

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

Ingeschat ongerief gedurende de studie:

- Risico op spontane danwel trauma/agressie gerelateerde bloedingen als gevolg van genotype: licht
- Induceren gewrichtsbloeding x 2: licht
- Bloedafname: licht
- Intra-articulaire injectie / orale toediening via drinkwater: licht
- Anesthesie voor de ingrepen: licht

Cumulatief wordt het risico ingeschat op matig.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Histologie postmortem is het primaire eindpunt van deze proef.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

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

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit onderzoek kijkt naar verschillende methoden om in te grijpen in het proces van de gewrichtsschade die ontstaat na een bloeding. Tijdens de experimenten wordt gekeken naar het effect van drie interventies (ijzerchelator, IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) op bloed-geïnduceerde artropathie. Om dit onderzoek uit te voeren maken we gebruik van zogenaamde hemofilie A muizen (B6;129S4-F8-tm1Kaz/J). Dit zijn genetische gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno-en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie. De fokpaartjes worden verkregen via het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Deze bijlage omschrijft de opzet voor een fok met ongerief.

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.

Op basis van de sample size berekening zoals beschreven in bijlage I verwachten we 58 muizen per experiment (2 groepen van 29 dieren) nodig te hebben en in totaal zo'n 348 dieren. Om dit benodigde aantal proefdieren te verkrijgen word er een fok met de B6;129S4-F8-tm1Kaz/J muizen opgezet. Er zal worden gestart met 9 fokouders: 3 mannelijke en 6 vrouwelijke proefdieren.

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

Gezien de grootte van de groepen en de beperkte capaciteit zullen de beoogde experimenten gefaseerd uitgevoerd worden, waardoor er per experiment de benodigde nakomelingen gefokt worden. Hierdoor hoeven de muizen niet onnodig lang te zitten. De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd. Dit heeft als voordeel dat er per fase wordt gekeken of het voortzetten van het experiment zinvol is, wat onnodig gebruik van proefdieren kan voorkomen.

Voor de uitgebreide statistische strategie verwijzen wij u naar bijlage I paragraaf 2A.

## **B. De dieren**

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

Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J) worden verkregen uit het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Dit zijn genetisch gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie en zijn daarmee een uniek model voor het bestuderen van bloed-geïnduceerde artropathie. Voor onze experimenten hebben we in totaal 348 dieren nodig voor in totaal 6 experimenten. We zullen de dieren fokken per experiment en het experiment zelf ook gefaseerd uitvoeren met oog op de logistiek.

Er wordt gestart met 9 fokouders: 3 mannelijke dieren en 6 vrouwelijke proefdieren. Gegevens muis:

- Geslachtsrijp 5 weken
- Fokrijp 8-10 weken
- Draagtijd 19 (18-21) dagen
- Speenleeftijd 21-28 dagen
- Levensverwachting 1-2 jaar
- Gemiddeld 5 nakomelingen per kruising
- Aantal nestjes per vrouwtje: maximaal 2 (om partus gerelateerde problematiek te voorkomen)

Op basis van bovenstaande gegevens en eerdere ervaringen hebben we 18 fokpaartjes nodig om het benodigde aantal dieren voor één experiment (58 dieren) te fokken. De 18 fokvrouwtjes worden na de fok afgevoerd. De fokmannen kunnen deelnemen aan het experiment. Voor dit onderzoeksproject zijn in totaal dus  $6 \times 18 = 108$  fokvrouwen nodig. Per experiment zal een nieuwe fokopzet gemaakt worden en het aantal fokpaartjes zo nodig worden aangepast.

## **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: Proeven *in vitro* vormen een beperkte afspiegeling van de omstandigheden *in vivo* bij zo'n complex proces als het ontstaan van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade. Bovendien willen we het effect van verschillende methodes bestuderen op het niveau van het gewricht zelf, maar ook in relatie met het lichaam als geheel. Er zijn geen alternatieve modellen voor handen. Hemofilie in hemofilie A muizen gedraagt zich als hemofilie in de mens, waardoor de dieren uitermate geschikt zijn voor de experimenten. Humane studies op dit onderwerp bij hemofiliepatiënten zijn ethisch niet haalbaar.

Vermindering: Hoewel hemofilie in de mens vrijwel alleen bij mannen voorkomt, gebruiken we voor deze experimenten zowel mannetjes als vrouwtjes omdat het genotype dat toelaat. Daarnaast kunnen de fokmannetjes ook ingezet worden in het experiment zelf. Het gebruik van beide geslachten en de fokmannetjes in het experiment dragen bij aan het verminderen van het fokoverschot en de hoeveelheid dieren.

We berekenen op basis van specifieke sample size berekeningen per experiment het exacte aantal dieren. Bij de berekening wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door traumagerelateerde bloedingen ingecalculeerd moet worden. De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd. Dit heeft als voordeel dat er per fase wordt gekeken of het voortzetten van het experiment zinvol is, wat onnodig gebruik van proefdieren kan voorkomen (zie projectvoorstel 3.4.3). Daarnaast worden de dieren ook per experiment gefokt, zodat de muizen niet onnodig lang zitten.

Verfijning: Er zijn diverse dieren waarin hemofilie spontaan of via genetische modificatie voorkomt. Zo zijn er hond en muismodellen, die bruikbaar zijn voor preklinische studies *in vivo*. Modellen in ratten, schapen en duiven zijn minder uitgewerkt.

Het voordeel van het muismodel is dat hemofiliemuizen, in tegenstelling tot de hond, minder de neiging hebben tot spontaan bloeden in weefsels of gewrichten. Dit geeft een betere controle over de experimentele condities en de fok. Daarnaast is er reeds ruime ervaring met het fokken van deze muizen in onze onderzoeksgroep opgedaan en is geleerd van eerdere welzijnsevaluaties. Een voorbeeld is dat vrouwtjes maximaal 2 nestjes mogen krijgen, omdat er na meerdere nestjes een grotere kans op overlijden leek te zijn. Sinds het instellen van deze maatregel is er geen oversterfte van de fokvrouwen meer voorgekomen.

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.

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest. Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressie-gerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest. Bij alle dieren wordt er extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerd trauma.

Uit onze ervaring met het fokken van hemofiliemuizen blijkt dat er geen partusgerelateerde uitval ontstaat als vrouwtjes maximaal twee nestjes krijgen. Dit hebben we dan ook opgenomen in ons fokprotocol.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Fokmannen worden solitair gehuisvest. De overige mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest, maar bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressiegerelateerd trauma worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband 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.

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.



Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er is een hoger risico op wekedelen bloedingen en agressie- en/of trauma gerelateerde bloedingen. Uit onze ervaring blijkt dat er geen partusgerelateerde uitval gezien wordt als vrouwtjes maximaal twee nestjes krijgen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak voor de verhoogde kans op wekedelen bloedingen bij agressie of trauma is de stollingsfactor VIII deficiëntie, ook bij de homozygote vrouwtjes.

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

Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannelijke dieren vanaf de leeftijd van zes weken alleen gehuisvest. Bij alle dieren wordt extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerde bloedingen. Vrouwtjes krijgen maximaal twee nestjes.

### 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 specifiek voor de fok:

- Ernstige verwondingen / wekedelen bloedingen door agressie of trauma (Hemofiliemuizen bloeden in principe niet spontaan).

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

Op basis van welzijnsevaluatie 2012 en eerdere ervaringen: 10%.

### K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief ten gevolge van het genotype wordt ingeschat als licht.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De fokmannetjes worden ingezet in de experimenten. De fokvrouwtjes worden na de fok (maximaal 2 nestjes) gedood omdat uit eerder een oversterfte van fokvrouwtjes met > 2 nestjes werd gezien.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016451  
**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 7 april 2016  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven  
Geachte [REDACTED]

Op 26 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade" met aanvraagnummer AVD115002016451. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 23 maart 2016 hebben wij bij de behandeling van uw aanvraag geconcludeerd dat de aanpassingen en wijzigingen naar aanleiding van het DEC advies niet waren doorgevoerd in de door u ingediende documenten. Op ons verzoek heeft u op 23 maart 2016 de juiste versie van de documenten ingediend.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade" starten. De vergunning wordt afgegeven van 7 april 2016 tot en met 1 april 2021. De startdatum van uw project wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt. Aanvullend stelt de CCD twee algemene voorwaarden om te voldoen aan datgene wat voort komt uit artikel 10a. van de wet. 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 24 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. In aanvulling hierop worden de twee algemene voorwaarden gesteld die aan meerjarige projecten worden verbonden. 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**

7 april 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD115002016451**Bezwaar**

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

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

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

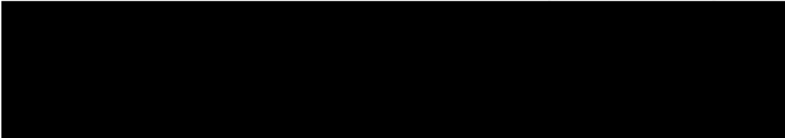
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

**Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

**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 woonplaats: 3501 AA Utrecht  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 april 2016 tot en met 1 april 2021, voor het project "Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade" met aanvraagnummer AVD115002016451, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 februari 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 23 maart 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 23 maart 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 24 februari 2016, ontvangen op 26 februari 2016;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag zoals ontvangen op 23 maart 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Muismodel - Experimenten	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J)	348	Matig
Fok met ongerief	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J) fokvrouwen	108	Licht

### Algemene voorwaarden

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

1) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen in afstemming met de IvD.

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

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

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

## **Einde van een dierproef**

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

**Datum**

7 april 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD115002016451

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

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

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

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

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 19 april 2016 16:25  
**Aan:** 'dec-utrecht@umcutrecht.nl'  
**Onderwerp:** terugkoppeling besluit AVD115002016451

Geachte leden van DEC Utrecht,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning aangeboden waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project "Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade" met aanvraagnummer AVD115002016451, uw interne code 2015.II.550.041.

De CCD heeft uw advies gevolgd en besloten het project te vergunnen. Aan de vergunning zijn twee algemene voorwaarden verbonden om te voldoen aan datgene wat voortkomt uit artikel 10a van de wet.

De aanvrager is van het besluit op de hoogte gebracht. De CCD dankt u voor het uitbrengen van uw advies,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**

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

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

.....  
T: 0900 2800028

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



Inventaris Wob-verzoek W16-13S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016454</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x	x	
9	Mail terugkoppeling DEC 29-4-2016				x		x	x	

09 MRT 2016



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

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

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters  
 Functie  
 Afdeling  
 Telefoonnummer  
 E-mailadres

Dhr.  Mw.

- 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 07 \_04 \_2016  
 Einddatum 07 \_04 \_2021

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën tegen pneumokokken infecties

- 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  
 E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,00 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, 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:

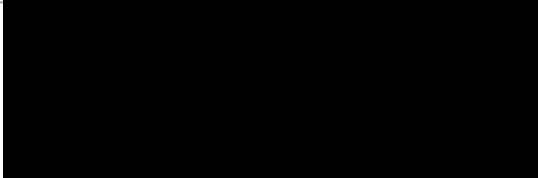
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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.

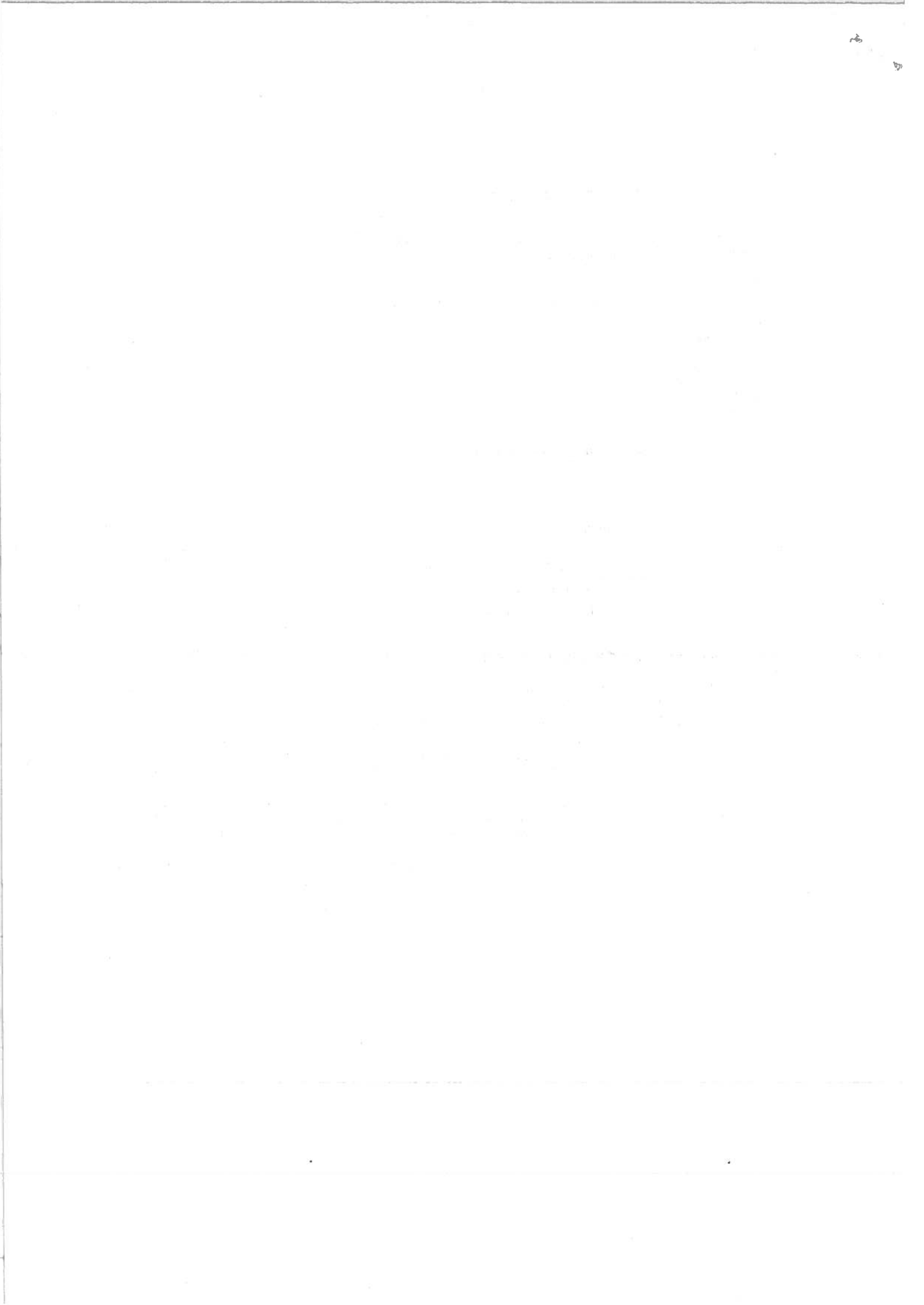
Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 07 - 03 - 2016

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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

**1 General information**

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3 Provide the title of the project.	Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections

**2 Categories**

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input type="checkbox"/> Basic Research <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use or 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 <input type="checkbox"/> Higher education or training
---	--

---

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

#### **The burden of respiratory infections by *Streptococcus pneumoniae***

The global burden of respiratory infections caused by the bacterium *Streptococcus pneumoniae* (the pneumococcus), is still high despite the availability of antimicrobiological agents and childhood vaccines. The pneumococcus kills approximately 500,000 children less than five years of age each year, mainly in the developing world (Source: World Health Organization). It is the leading cause of childhood pneumonia, the number one killer of children under five in the developing world. Pneumococcal disease can be treated with antibiotics, although antibiotic-resistant strains are emerging worldwide. This highlights the need for preventive strategies.

#### **Pneumococcal disease**

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

#### **Pneumococcal vaccines**

All currently marketed pneumococcal vaccines are based on the capsular polysaccharide, either non-conjugated (23-valent) or conjugated (7,9,10&13-valent) to a carrier protein. The conjugated vaccines appear to be very efficacious against the homologous serotypes. However, more than 90 different serotypes have been identified so far and there is evidence that mass vaccination results in serotype replacement. More serotypes need to be included for broader protection, which, however, has numerous technical and financial limitations. Also, the level of protection against otitis media is limited. Currently the research on vaccines focuses on the development of a "common protein" vaccine that could provide broad

protection against all serotypes, which has also the potential to protect against otitis media. Protein antigens with protective potential are currently being studied as new vaccine components (Miyayi et al. Cell Mol Life Sci. 2013 Sep; 70(18):3303-26).

### **Mucosal vaccination**

By far the most vaccines that are currently on the market are needle-based, which complicates mass-vaccination programs and is not always leading to the most effective responses, especially in the case of mucosal (respiratory and gastrointestinal) infections. There is strong evidence that, in order to induce a protective immune response against respiratory infections, mucosal application of antigens is most optimal. No mucosal vaccine against *S. pneumoniae* has yet been developed. Natural colonization or carriage induces both mucosal and systemic humoral and cellular immune responses. Enhancing those responses by mucosal vaccination is an attractive immunization approach as it mimics the natural route of infection (Riese et al. Expert Opin Drug Deliv. 2014 Oct;11(10):1619-34).

### **Particulate-based vaccine formulations**

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

### **3.2 Purpose**

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

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

### **The main objective of our project is to develop mucosal vaccines to protect against *S. pneumoniae* infections using particulate delivery strategies.**

Research questions:

- Which antigens are needed to induce broad protection by intranasal vaccination to prevent infection with different *Streptococcus pneumoniae* strains?



- What is the optimal particle-based formulation in order to induce a strong protective immune response at the port of entry (i.e. intranasal cavity) for *S. pneumoniae*?
- What is the mechanism of protection induced by the particle-based formulations and can we enhance effective immune responses against pneumococcal protein antigens by intranasal vaccination?

#### Explanation of feasibility:

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

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

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

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

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

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

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

### 3.3 Relevance

---

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

---

*Streptococcus pneumoniae* is an important cause of severe infections such pneumonia, meningitis, bacteremia and otitis media. People at risk of developing pneumococcal infections are young children, the elderly and immune-compromised persons. The pneumococcus is the leading cause of childhood pneumonia, the number one killer of children under five years in the developing world. The efficacy of the currently available vaccines are highly suboptimal as they do not protect against all serotypes, and the leads to resurgence of pathogenic serotypes causing diseases that are not covered by the current vaccines. The development of effective vaccines with broad protection will have major benefits in reducing morbidity, mortality and health care costs. Analysis of the effective induction of mucosal vaccine responses will contribute to the improvement of vaccination

strategies and in developing novel vaccine formulations resulting in optimal protection against important respiratory pathogens, such as *S. pneumoniae*.

### 3.4 Research Strategy

---

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

---

The project contains three parts, of which the first two parts will be launched simultaneously:

1. Identification of vaccine antigens for the induction of broad protection by intranasal vaccination.
2. Testing and optimization of particles-based formulations to further improve broad intranasally-induced protection.
3. Determine the optimal intranasal vaccine formulation for protection against pneumococcal colonization

#### Part 1

Different state-of-the-art antigen discovery technologies are currently developed to identify virulence-associated proteins, which are potential new vaccine antigens from *Streptococcus pneumoniae*. Transposon sequencing (Tn Seq) is a transposon-based technology. Transposons are mobile genetic elements that are capable of efficient genomic insertion. Insertion of a transposon leads to gene inactivation. By whole-genome transposon insertion mutagenesis, mutant libraries can be generated. These libraries allow for the selection of genes essential for infection, thus encoding potential vaccine antigens. Mimicking in vivo growth (MIVG) is an in vitro method to determine which proteins are expressed during infection by mimicking in vivo conditions. During infection (in vivo growth), bacterial pathogens express genes that are usually not expressed under laboratory conditions. From a pathogen's perspective, access to adequate nutrition is of fundamental importance for survival in the host. The ability to counter microbial survival by restricting essential nutrients is referred to as nutritional immunity. By depleting such essential elements, in vivo conditions can be mimicked in vitro. In vivo expression (IVE) analyses have been successfully used for different pathogenic bacteria to study gene expression during infection. Bacteria will be collected from samples taken during infection of animals (i.e. nasopharyngeal aspirate and lung lavages) to isolate bacterial mRNA which will be used for sequencing and subsequent analyses to determine which genes are expressed during infection, as the encoded proteins are potential interesting vaccine candidates.

With the unique combination of these tools, the most promising vaccine antigens will be selected. Antigens that have been selected as potential new vaccine antigens will be tested for their protective potential against colonization. These antigens will be immunized intranasally with a known mucosal adjuvant, such as Cholera Toxin subunit B. The protective potential will be evaluated for their ability to reduce the level and/or duration of colonization by pneumococci as well as detailed analysis of the antibody responses induced. Variable antigens that show sequence diversity among strains will be tested in challenge with heterologous pneumococcal strains as well in order to establish its efficacy against a broad spectrum of pneumococcal strains.

#### Part 2

For an efficient and lasting immune response to vaccination, antigens should be presented as particles such as Outer Membrane Vesicles (OMV), Polymersomes ((FDA approved synthetic particles originally made for drug delivery) ██████████ to take advantage of the multivalency effect. Particle-based vaccines, will be tested in vaccination experiments with model pneumococcal antigens that have already been shown to induce partial protection against colonization by pneumococci. The use of model antigens is chosen, to avoid the need for having to

test the novel antigens selected in part 1 in multiple particulate delivery systems, which would result in an increase in the total amount of animal experiments. Different variants of the particles will be tested for the induction of an optimal immune response against colonization. Variation in particle properties such as size, shape, immune-modulating and composition of the particles will be studied in immunization and pneumococcal colonization studies. For variation in composition OMV's of different bacterial backgrounds (of Gram-negative bacteria, since pneumococci are Gram-positive bacteria that do not produce membrane vesicles of its own) will be engineered with various traits. For polymersomes originated by the synthesis of different block polymers can be engineered for optimal immune induction. [REDACTED]

[REDACTED]. Efficacy against the various vaccines will be determined by their ability to reduce the level and/or duration of colonization by pneumococci. To understand the induction and kinetics of humoral and cellular immunity at the mucosal (intranasal) level induced by the different particle formulations and to identify the immune correlates of protection different immunological investigations will be conducted. IgA and IgG responses in the nasal cavity, and different cytokines and chemokines, which are in addition to antibodies important immune effectors, will be measured at different time points. In addition the influx of immune cells, such as APCs, in particular macrophages but also T- and B-cells will be determined using immunohistochemistry and flow cytometry. Understanding the induction of a protective immune responses at the intranasal level is crucial to develop novel vaccines.

### Part 3

The antigens with the best protective potential as evaluated in part 1, which resulted in reduction of colonization and with the ability to induce broad range protection against multiple serotypes, will be tested with the most promising particle strategy as evaluated in part 2. Antigens will be tested individually as well as in combinations in order to finally selected for a prototype vaccine formulation.

For surface exposure on particles, production of the whole protein is not always possible (like on outer membrane vesicles), and derived peptides are often easier to produce than full length proteins.

For all three parts, a colonization model will be used to determine the efficacy of the vaccines. After 3 immunizations, mice are intranasally colonized with pneumococci, and bacterial load and specific immune parameters can be analyzed.

---

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.

All relevant information for the studies involved is described in the research strategy.

---

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

The purpose of these studies are focussed on inducing effective mucosal immune responses in mucosal vaccination with particulate formulations of antigens. The success of these formulations depend on the antigens used as well as on the particulate system chosen. Both the selection of antigens with protective potential and the ability to induce broad protection against multiple serotypes as the choice for a specific particulate vaccine delivery system with its respective characteristics for the induction of a proper immune response are of great importance. It provides the opportunity to find

the optimal induction of an effective immune response to protect against pneumococcal infections. This research will lead to the development of a pneumococcal, particle-based, mucosal vaccine prototype.

The milestones for this project for the coming 5 years are formulated as follows:

- Milestone 1: The most promising broadly protective antigens have been selected.
- Milestone 2: The different particles and variation in characteristics, such as optimal shape, size and modification of particles have been tested for induction of an optimal immune response against colonization.
- Milestone 3: Selection of a particle-based delivery system most optimal of inducing an protective immune responses as a for further vaccine studies.
- Milestone 4: Establishment of optimal composition of the in milestone 3 selected particle-based delivery system together with two or more proteins as selected in Milestone 2. Optimal induction of an immune response is established by:
  1. reduction in the level of colonization compared to negative control groups (indication of vaccine efficacy)
  2. antibody responses in serum and nose lavages (indication of immune responses)
  3. cellular immunity such as analysis of cytokines important for clearance of pneumococcal colonization, such as IL-17 and IFN-gamma (indication of type immune response).

The reduction in colonization is the most important parameter. Since serum and nose lavage is collected when the animals are sacrificed, antibody responses as well as cellulair responses can be established in the same samples.

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	Colonization model

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

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

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

---

#### **Colonization model**

The protection elicited by mucosal pneumococcal vaccines will be determined in a colonization model, the mildest model available, since mice will not develop invasive disease. In this model vaccines will be administered intranasally under inhalation anesthesia. Colonization in the nose is induced three weeks after the last immunization to ensure proper immune induction has been elicited, and reduction in colonization together with immunological parameters is the read-out for vaccine efficacy.

The primary outcomes of the colonization model are:

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

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

---

Mice will be immunized three times intranasally under inhalation anesthesia with a 10 µl volume. The animals will be immunized with 2-3 week intervals between immunizations, as done in our previous studies and based on optimal vaccination schedules as described for these type of vaccine studies. Vaccines will be composed of pneumococcal antigens administered with an mucosal adjuvant. In parts 2 and 3 of our research strategy, the antibodies will be administered as part of a particulate delivery systems with a mucosal adjuvant and additionally, immune modulating molecules can be administered for optimization of the required immune response. Blood is collected from the tail vein for preparation of serum before the first and 2 weeks after the final immunization samples in order to establish immunogenicity of the vaccines by determination of antibody titers. Mice will be infected intranasally under inhalation anesthesia with a 10 µl volume. Mice will be sacrificed 1-14 days post infection, depending on the read-out timepoint required for the individual experiment. A nose lavage will be performed to collect bacteria from the nose in order to be able to determine primary and secondary read-out parameters. Inhalation anesthesia is used for the intranasal administration of vaccines and infection dose in order to deliver this properly and reduce the spread to a minimum.

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

---

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

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

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

## **B. The animals**

---

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

---

### Mouse species

The colonization model using both inbred and outbred mice is an established animal model in our laboratory. The inbred strains BALB/c and C57BL/6J are most commonly used in colonization models described in literature. In BALB/c mice the immune response is predominantly Th2-skewed, while in C57BL/6J mice the response is predominantly Th1-skewed. The use of the (CB6)F1 generation hybrid mice of a cross between BALB/c and C57BL/6J allows studies in a more intermediate Th1/Th2 background. We will be using one mouse species for the screening of the antigens and the particle-based vaccine delivery systems. As pneumococcal vaccines need to induce protection in a broad range of individuals it is important to allow the use of different mouse strains with a different Th1/Th2 skewing in the final experiments of the third part.

Sex-based differences in susceptibility to pneumococcal infections have been described in literature (Kadioglu et al, 2011), so using both sexes in experiments has to be avoided to reduce spread (and group size) to a minimum. We prefer to use female mice over male mice, since they are easier to maintain in groups as they are less aggressive.

### Estimated number of animals

Taken together, as outlined in the rest of the proposal, there are 3 experimental parts.

For the first part, identification of vaccine antigens, we need a maximum number of 480 mice. For performing experiments in which we will test 5 different protein antigens per experiment together with a negative control (adjuvant only) and a positive control with group sizes of around 10 mice (based on previous experiments) and control groups of 15 mice, this will be a number of 80 mice per experiment. We estimate to test a maximum number of 20 antigens and to test 10 of these antigens in heterologous challenge (with a different serotype), this will make a maximum total number of 480 mice for the first part of the research strategy.

For the second part, the particle-based vaccine delivery systems, we need a maximum number of 900 mice. In order to establish the optimal induction of an immune response three particle-based vaccine formulations will be studied for their antigen delivery capacity and immune induction capacity. To be able to vary the particles according to size, shape, composition, the addition of immune modulating molecules and display of the

antigens, 5 experiments will be estimated per particle studied, with 6 groups of around 10 mice per group. This will make a maximum amount of 300 mice per particle, and a maximum number of 900 mice for the second part of the research strategy.

For the third part, the most promising antigens with protective potential selected that will be formulated with the specific particulate delivery vehicle selected, we need a maximum number of 510 mice. To be able to conduct experiments for at least three variants of a selected protein (full length protein and derived peptides) for 4 proteins, with group sizes around 10 and including positive and negative controls, 180 mice will be needed. The most promising antigen candidates will be combined in single vaccine formulations and compared in efficacy to single antigen formulations. This will be done in Three different mouse strains, to be able to evaluate the protective potential in different Th1/Th2 skewed backgrounds. For this final part, per mouse strain, 110 mice will be needed 110 mice will be needed for 8 groups and a positive and negative control, so 330 mice will be needed. This will make a total number of 180+ 330 + 510 mice for the third part of the research strategy.

Hence, the maximum number of mice needed for this project is estimated to be  $480 + 900 + 510 = 1890$  mice.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse:CB6F1, C57BL/6, BALB/c	Registered breeding facility/supplier within EU	1890	6-8 weeks at arrival

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement



Protective effects against colonization cannot be studied in vitro and requires animal models. The mouse colonization model is the most convenient small animal model that can be used to measure colonization and the lowest animal species sufficient to study this. Other colonization models are developed in rhesus macaques (Philipp et al., 2006) and ferrets (McCullers et al., 2010).

#### Reduction

We will not use more animals than the minimal amount that is needed to obtain statistically significant differences between the groups. Intranasal immunization and infection procedures are performed under inhalation anesthesia to reduce spread (and group size) to a minimum. Preselection of antigens will be done by different antigen discovery technologies that enable us to select antigens predicted to be able to have a role in protection based on criteria as presence on the bacterial surface, conservation and predicted MHC epitopes. The particulate antigen delivery systems will be evaluated for their immunogenicity and potential of inducing protection in studies using model pneumococcal antigens known to be involved in protection, so the selected antigens of part 1 do not have to be tested in all particulate system studied in part 2.

#### Refinement

Animals will be housed in small groups. The colonization model is the mildest infection model, since these animals will not develop disease. The highest discomfort in this model will be awakening from anesthesia used for intranasal immunization and intranasal infection. Since vaccination and infection experiments cannot be performed without these immunizations and administration of infection, the experiment cannot be performed with less discomfort for the animals. With the procedures discussed previously, we believe this is the best way to perform such an experiment with regard to optimal experimental outcome relevant for induction of protection and immune responses induced, with as little discomfort to the animals as possible.

---

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

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

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

not applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

### G. Location where the animals procedures are performed

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

---

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

---

The colonization model is a mild model, since mice will not develop invasive disease. The mice will experience some discomfort caused by the use of anesthesia used for intranasal immunizations and infection. If case serum or plasma is needed, mice will experience some discomfort of blood collection from the tail vein in order to obtain pre-immune and post immune sera in vaccination studies. Adverse effects on welfare caused by the use of vaccines are low, although some weight loss may occur post immunization, either because of the use of anesthesia or local immune reactions to the vaccine formulation used.

Explain why these effects may emerge.

---

The discomfort of the anesthesia is caused by waking up from anesthesia.  
The discomfort of blood collection from the tail vein is caused by pre-heating and some restrained while being pricked with a needle.

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

---

Inhalation anesthesia is used, which allows rapid induction and recovery.  
Blood collection from the tail vein and administration is performed by experienced researchers in order to reduce the discomfort to a minimum.

### **J. Humane endpoints**

---

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

---

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

---

- Loss of body weight of more than 15% in 1-2 days or more than 20% from the start of the experiment, according to the international guidelines of humane endpoint.
- On signs of invasive disease, such as abnormal behavior, reduced mobility, pre-moribund state and severe suffering.

All above described criteria could be manifested in case of complication of disease, i.e. sepsis or pneumonia, which is very unlikely in the described colonization model. If any of this states is determined, mice will be removed from the experiment.

Indicate the likely incidence.

---

The chance of reaching humane endpoints will be very low, since the model used is a colonization model and these mice will not develop invasive disease. So human endpoints can be reached because of causes not linked to experimental procedures or low infection related incidence of less than 1%.

#### **K. Classification of severity of procedures**

---

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe ).

---

The expected severity is mild for all mice, since mice will not develop disease.

## **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

End of experiment. We need to assess bacterial recovery in the nasal tissue, for that we need to harvest nasal tissue by opening up the skull/nasal cavity.

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

---

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

---

Yes

---

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0139
2. Titel van het project: Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën tegen pneumokokken infecties
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 22-12-2015
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 05-01-2016
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 13-01-2016 tot 25-01-2016 en van 01-02-2016 tot 22-02-2016
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 25-01-2016 en 22-02-2016
  - advies aan CCD: 07-03-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 13-01-2016
  - Strekking van de vragen:

### Project Proposal:

-3.2 Dit is doorlopend onderzoek, dat al een tijd bezig is en dat ook na de komende 5 jaar nog zal doorgaan. Dat heeft tot gevolg dat niet geheel duidelijk wordt wat de onderzoekers in de komende 5 jaar willen bereiken. Mag de commissie aannemen dat het realistisch is dat dit onderzoek binnen de komende 5 jaar zal leiden tot "the development of a pneumococcal, particle-based, mucosal vaccine prototype" dat eventueel klinisch kan worden getest? Het is

bij dit type doorlopend onderzoek wellicht goed om bij vraag 3.4.3 een aantal “milestones” op de weg naar dat doel voor de komende 5 jaar aan te geven (zie ook vraag 3.4.3).

-3.2 De onderzoekers worden verzocht de jarenlange betrokkenheid bij het onderzoek naar infectieziekten en vaccinontwikkeling te illustreren met enkele referenties naar eigen onderzoek waar deze betrokkenheid uit blijkt en waaruit blijkt dat het muis vaccinatie en kolonisatie model een geaccepteerd en gevalideerd model is.

-3.4.1 Onderdeel 1: Wat zijn de nieuwe ‘state of the art antigen discovery technologies’ waar de onderzoekers op duiden en aan welke virulentie-geassocieerde antigenen denken de onderzoekers? Hoe worden de meest veelbelovende antigenen geselecteerd?

-3.4.1 Onderdeel 3: Uit de beschrijving van de dierproeven in de bijlage blijkt dat zowel het volledige eiwit als peptides daarvan zullen worden getest. Deze beschrijving ontbreekt hier, evenals de uitleg waarom dit belangrijk is voor de ontwikkeling van een vaccin.

-3.4.3 Welke milestones verwachten de onderzoekers in hun onderzoek de komende 5 jaar te bereiken?

-3.4 Bij het opwekken van een immuunrespons zijn zeer veel factoren van belang. Wat zijn de belangrijkste factoren in dit veld, en van welke factoren verwachten de onderzoekers de meeste impact? De commissie zou graag een prioritering van de te onderzoeken factoren in de beschrijving van de strategie zien.

#### **Description of Animal Procedures:**

-B, De onderzoekers willen drie muizenstammen gebruiken, met elk een iets ander patroon in de immuunrespons. Het blijkt niet de bedoeling om alle experimenten in alle muizenstammen uit te voeren omdat het aantal benodigde muizen berekend wordt op basis van een eenmalige uitvoering van experimenten. Waar hangt de keuze voor de muizenstam van af? De onderzoekers worden verzocht dit duidelijker toe te lichten.

- Datum antwoord: 25-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

#### **Project Proposal:**

- 3.2 Mucosale vaccinatie tegen pneumokokken en andere respiratoire pathogenen is een speerpunt van het onderzoek op ons lab en dit zal in de toekomst ook een belangrijke focus van het onderzoek blijven. Het is niet ondenkbaar dat dit onderzoek over 5 jaar voor een van de “particle-based mucosal vaccine prototypes” voorgezet zal worden in een eerste klinische studie in mensen. Voor de komende 5 jaar is het doel om te komen tot het ontwerp van een particle-based mucosal vaccine prototype, dat in staat is tot het induceren van brede bescherming tegen meerdere serotypes. De inductie van een optimale immuunrespons voor deze bescherming zal bepaald worden door de selectie van de te gebruiken antigenen in combinatie met het te selecteren particle-based delivery systeem.

Het volgende is toegevoegd bij 3.4.3.: The milestones for this project for the coming 5 years are formulated as follows:

Milestone 1: The most promising broadly protective antigens have been selected.

Milestone 2: The different particles and variation in characteristics, such as optimal shape, size and modification of particles have been tested for induction of an optimal immune response against colonization.

Milestone 3: Selection of a particle-based delivery system most optimal of inducing an protective immune responses as a for further vaccine studies.

Milestone 4: Establishment of optimal composition of the in milestone 3 selected particle-based delivery system together with two or more proteins as selected in Milestone 2.

-3.2 De volgende referenties van ons eigen onderzoek met betrekking tot mucosale vaccinatie en het kolonisatie model zijn toegevoegd:

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

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

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

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

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

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

-3.4.1 Onderdeel 1: De volgende state-of-the-art antigen discovery technologies zullen worden gebruikt (dit is tevens toegevoegd bij 3.4.1):

Transposon sequencing (Tn Seq) is a transposon-based technology. Transposons are mobile genetic elements that are capable of efficient genomic insertion. Insertion of a transposon leads to gene inactivation. By whole-genome transposon insertion mutagenesis, mutant libraries can be generated. These libraries allow for the selection of genes essential for infection, thus encoding potential vaccine antigens.

Mimicking in vivo growth (MIVG) is an in vitro method to determine which proteins are expressed during infection by mimicking in vivo conditions. During infection (in vivo growth), bacterial pathogens express genes that are usually not expressed under laboratory conditions. From a pathogen's perspective, access to adequate nutrition is of fundamental importance for survival in the host. The ability to counter microbial survival by restricting essential nutrients is referred to as nutritional immunity. By depleting such essential elements, in vivo conditions can be mimicked in vitro.

In vivo expression (IVE) analyses have been successfully used for different pathogenic bacteria to study gene expression during infection. Bacteria will be collected from samples taken during infection of animals (i.e. nasopharyngeal aspirate and lung lavages) to isolate bacterial mRNA which will be used for sequencing and subsequent analyses to determine which genes are expressed during infection, as the encoded proteins are potential interesting vaccine candidates.



-3.4.1 Onderdeel 3: Het volgende is toegevoegd bij 3.4.1:

For surface exposure on particles, production of the whole protein is not always possible (like on outer membrane vesicles), and derived peptides are often easier to produce than full length proteins.

-3.4.3 Zie antwoord 3.2

-3.4.3 Het volgende is toegevoegd aan 3.4.3:

Optimal induction of an immune response is established by:

1. reduction in the level of colonization compared to negative control groups (indication of vaccine efficacy)

2. antibody responses in serum and nose lavages (indication of immune responses)

3. cellular immunity such as analysis of cytokines important for clearance of pneumococcal colonization, such as IL-17 and IFN-gamma (indication of type immune response).

The reduction in colonization is the most important parameter. Since serum and nose lavage is collected when the animals are sacrificed, antibody responses as well as cellular responses can be established in the same samples.

#### **Description of Animal Procedures:**

-B, Het volgende is toegevoegd bij B:

We will be using one mouse species for the screening of the antigens and the particle-based vaccine delivery systems. As pneumococcal vaccines need to induce protection in a broad range of individuals it is important to allow the use of different mouse strains with a different Th1/Th2 skewing.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
  
- Datum: 01-02-2016
- Strekking van de vragen:
  - Er blijft nog één onduidelijkheid over. Op de vraag waar de keuze voor de muizenstam van afhangt, antwoordt u: We will be using one mouse species for the screening of the antigens and the particle-based vaccine delivery systems. As pneumococcal vaccines need to induce protection in a broad range of individuals it is important to allow the use of different mouse strains with a different Th1/Th2 skewing. Het is nog steeds niet geheel duidelijk hoe de keuze voor een muizenstam wordt gemaakt. Het tweede deel van het antwoord suggereert (wederom) dat er in bepaalde delen van de studie getest zou kunnen worden op meerdere stammen om individuele verschillen na te bootsen. Uit de berekening lijkt echter te volgen dat u steeds op maar één muizenstam test. U gaat dus vermoedelijk toch een keuze maken. Het zou goed zijn als u vermeldt hoe u die keuze op een goede manier denkt te kunnen maken.
  
- Datum antwoord: 22-02-2016
- Strekking van de antwoorden:
  - Wij hebben ervoor gekozen om het laatste experiment van het derde gedeelte te testen in de 3 verschillende aangegeven stammen, om zo de vaccins te kunnen testen met verschillende Th1/Th2 skewing.

Het volgende hebben wij gewijzigd in de tekst bij choice animals: As pneumococcal vaccines need to induce protection in a broad range of individuals it is important to allow the use of different mouse strains with a different Th1/Th2 skewing in the final experiments of the third part.

En aan het eind van deze paragraaf: The most promising antigen candidates will be combined in single vaccine formulations and compared in efficacy to single antigen formulations. This will be done in three different mouse strains, to be able to evaluate the protective potential in different Th1/Th2 skewed backgrounds. For this final part, per mouse strain, 110 mice will be needed for 8 groups and a positive and negative control, so 330 mice will be needed. This will make a total number of  $180 + 330 = 510$  mice for the third part of the research strategy. Hence, the maximum number of mice needed for this project is estimated to be  $480 + 900 + 510 = 1890$  mice.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Expert advies

#### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig.
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. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop mucosal vaccines to protect against *S. pneumonia* infections using particulate delivery strategies.' Deze hoofddoelstelling is uitgewerkt in drie onderzoeksvragen betreffende de aard van de antigenen, de eigenschappen van de vaccin-deeltjes, en het mechanisme van de bescherming die ontstaat door vaccinatie. De uitkomsten van deze onderzoeksvragen zullen gecombineerd worden om een optimaal werkend intranasaal vaccin te ontwikkelen tegen *S. pneumoniae*. Tevens wordt duidelijk welke eigenschappen van antigenen en vaccin-deeltjes bijdragen aan een goede immunrespons tegen *S. pneumoniae* en mogelijk andere bacteriën die luchtweginfecties veroorzaken. Het is aannemelijk dat dit niet alleen zal leiden tot nieuwe prototype vaccins, maar ook tot inzichten die voor de ontwikkeling van bescherming tegen andere infecties gebruikt zullen kunnen worden.

De commissie vindt het belangrijk dat onderzoekers de gelegenheid krijgen om dergelijk doorlopend onderzoek uit te voeren, in dit geval om (bestaande) vaccins te blijven verbeteren op basis van eerder behaalde resultaten en nieuwe inzichten in het onderzoeksveld.

*S. pneumoniae* veroorzaakt ernstige infecties zoals longontsteking, meningitis, bloedvergiftiging en middenoorontsteking. In ontwikkelingslanden is deze bacterie de hoofdveroorzaker van longontsteking bij jonge kinderen en de belangrijkste doodsoorzaak van kinderen onder de vijf jaar. De resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere vaccins tegen *S. pneumoniae* en preventie van de infectieziekten die deze bacterie veroorzaakt. Vooral hele jonge kinderen en ouderen kunnen ernstige infecties ontwikkelen na blootstelling aan *S. pneumoniae*. Een ernstige infectie met *S. pneumoniae* wordt met antibiotica behandeld. Gezien de toenemende resistentie van bacteriën tegen antibiotica en de beperkte beschikbaarheid daarvan in ontwikkelingslanden, is het maatschappelijk van belang om effectieve vaccinatiestrategieën te ontwikkelen. De DEC acht meer inzicht in de factoren die bijdragen aan de effectiviteit van vaccinatie tegen luchtweginfecties en de ontwikkeling van effectieve vaccins tegen *S. Pneumoniae* van substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot de identificatie van antigenen die immuniteit tegen meerdere pneumokokken stammen opwekken, de bepaling van het effect van grootte, vorm en samenstelling van de vaccin-deeltjes op inductie van de humorale en de cellulaire immunrespons, en de identificatie van een optimaal werkend intranasaal vaccin tegen *S. pneumoniae* bij muizen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de intranasale vaccinaties en de intranasale infectie en de gevolgen daarvan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde bloedafnames uit de staartvene, de intranasale vaccinaties (3 maal) onder anesthesie, en de intranasale infectie onder anesthesie in als licht. De DEC is van mening dat de combinatie van deze factoren tot maximaal licht ongerief leidt. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De immunrespons na vaccinatie is dermate complex dat zij niet goed bestudeerd kan worden zonder proefdiermodellen. Het immuunsysteem van de muis lijkt voldoende op dat van de mens, zodat dit onderzoek ook translationele waarde heeft.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. Om de

omstandigheden in de populatie voldoende na te bootsen worden de meestveelbelovende vaccins in drie muizenstammen uitgetest. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1890 muizen.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Het gekozen model veroorzaakt het minste ongerief voor de dieren, omdat zij voordat ze ziek worden al worden gedood. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.  
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

#### **D. Ethische afweging**

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de aard van de antigenen die immuniteit tegen meerdere pneumokokken stammen opwekken en in het effect van grootte, vorm en samenstelling van de vaccin-deeltjes op inductie van de humorale en de cellulaire immuunrespons. Deze inzichten zullen leiden tot de identificatie van een optimaal werkend intranasaal vaccin tegen *S. pneumoniae* bij muizen. Het is aannemelijk dat deze resultaten op termijn zullen bijdragen aan de ontwikkeling van een effectief vaccin tegen *S. pneumoniae* voor humane toepassing. Het belang van meer inzicht in de factoren die de humorale en cellulaire immuunrespons vergroten en het beschikbaar komen van een effectief vaccin tegen *S. pneumoniae* acht de DEC substantieel, gezien de ernstige infecties die deze ziekteverwekker kan veroorzaken bij met name ouderen en jonge kinderen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren licht ongerief zullen ondervinden als gevolg van de intranasale vaccinaties en infecties in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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.

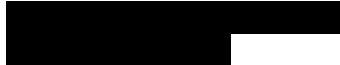
#### **E. Advies**

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**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  
AVD103002016454

**Bijlagen**

2

Datum 7 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016454. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **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, t.a.v. [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]

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]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN (628)

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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



**Over uw project**

Geplande startdatum: 7 april 2016  
Geplande einddatum: 7 april 2021  
Titel project: Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën tegen pneumokokken infecties  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Nijmegen  
Datum: 7 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**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  
AVD103002016454

**Bijlagen**

2

Datum 7 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 7 maart 2016

Vervaldatum: 6 april 2016

Factuurnummer: 16700454

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220: [redacted]

projectnummer:2015-0139: Verantwoordelijk onderzoeker: [redacted]

[redacted]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016454	€ 935,00

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



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

t.a.v. [REDACTED]

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD103002016454

**Bijlagen**

1

**26 APR. 2016**

Datum

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 7 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections" met aanvraagnummer AVD103002016454. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 april 2016 tot en met 7 april 2021.

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 7 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD een algemene voorwaarde. De voorwaarde staat in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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

#### **Bezwaar**

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

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

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

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

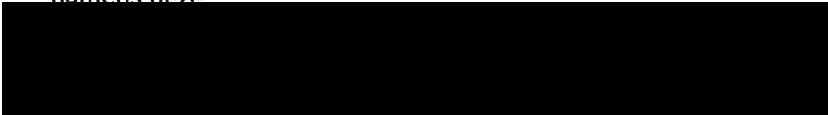
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
M. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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



## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 april 2016 tot en met 7 april 2021, voor het project "Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections" met aanvraagnummer AVD103002016454, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

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 7 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 maart 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 maart 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 maart 2016, ontvangen op 7 maart 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Colonization model	Muizen (Mus musculus) / CB6F1, C57BL/6, BALB/c	1890	Licht	

### Voorwaarden

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

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

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

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



**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 29 april 2016 12:42  
**Aan:**   
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD103002016454

Geachte RU DEC,

Op 07-03-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections' met aanvraagnummer AVD103002016454.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

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

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
 Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
 .....  
 T: 0900 2800028  
 E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)







## 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](http://www.zbo-ccd.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 <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>UMC Utrecht</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>3 0 2 4 4 1 9 7</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7									
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7																
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>Bolognalaan 50</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>12007</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>3501AA Utrecht</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL27INGB0000425267</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Universiteit Utrecht</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Bolognalaan 50	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
Straat en huisnummer	Bolognalaan 50																
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.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 . 0 4 . 2 0 1 6
- Einddatum 0 1 . 0 6 . 2 0 1 8
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Feasability study new dural sealant
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de veiligheid en werkzaamheid van lijm om het hersenvlies te dichten
- 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

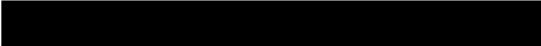
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur


## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening


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

Naam 

Functie 

Plaats Utrecht

Datum 07-03-2016

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

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

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

De dura mater is een vlies rondom de hersenen en beschermt de hersenen en het ruggenmerg. De dura kan in sommige gevallen niet lekvrij gesloten worden na een operatie. Door de lange tijdsduur bij hersenoperaties kan de dura wat stugger worden, dit bemoeilijkt het dichtmaken van de dura. Vooral bij ouderen is de dura erg dun en is het moeilijker de dura te hechten zonder schade aan te brengen. Als de dura niet goed gehecht kan worden, zal dit tot lekkage van de hersenvloeistof leiden. Lekkage van de hersenvloeistof is een van de meest voorkomende complicaties bij de neurochirurgie en kan leiden tot wondgenezingsproblemen en daaruit voortvloeiende ernstige infecties. Het aantal complicaties door dura sluitingsproblemen wordt geschat op 10-15% van alle intradurale operaties. Gemiddeld komen er ongeveer 1500-2000 intradurale procedures per jaar bij een neurochirurgische unit, dit komt neer op 150-200 patiënten per jaar per unit. Er zijn 12 neurochirurgische units in Nederland, dat zou neerkomen op 18000 tot 24000 procedures per jaar. Van deze patiënten per unit zullen er ongeveer 30-50 een nieuwe behandeling moeten ondergaan. Dit kan zijn dat ze (ter observatie) voor een langere periode in het ziekenhuis moeten verblijven, een antibiotica behandeling moeten ondergaan, een drainage krijgen met een drain in de rug of zelfs nog een keer geopereerd moeten worden. Dit kan leiden tot ernstige invaliditeit of zelfs de dood.

Deze complicaties kunnen theoretisch worden voorkomen met een lijm/sealant die ervoor zorgt dat er geen lekkage meer kan optreden na de operatie.

Tijdens dit translationele onderzoek wordt er een lijm/sealant getest die door ons in vitro is ontwikkeld, en die in potentie een significant aantal lekkages kan verminderen.

Het gebruik van een lijm tijdens het sluiten van het hersenvlies is tegenwoordig in opkomst, maar is gek genoeg relatief weinig beschreven in de literatuur. Zeker basale studies ontbreken in de literatuur, en het onderzoek naar deze producten is sterk industrie en commercie gedreven. Hier volgen enkele belangrijke voorbeelden van beschikbare studies:

1. Preul et al (Preul MC, Campbell PK, Bichard WD, Spetzler RF. Application of a hydrogel sealant improves watertight closures of duraplasty onlay grafts in a canine craniotomy model. J Neurosurg 2007;107:642-50) beschrijft een hondenmodel (n=12 Coonhound dogs) met een gat van 1.5 cm. De lijm duraseal in combinatie met een donordura (duragen or Durepair) versus the donordura. De hydrogel lijm in combinatie met collagene donordura's verlaagt de CSF lekkage en functioneert als een adhesie barriere.

2. Kacher et al (Kacher DF, Frerichs K, Pettit J, Campbell PK, Meunch T, Norbash AM. DuraSeal magnetic resonance and computed tomography imaging: evaluation in a canine craniotomy model. Neurosurgery 2006;58:ONS140-7; discussion ONS-7) heeft een MRI en histologie studie gedaan over de absorptiegraad van duraseal. De histologie toonde goede genezing van de botlap, volledige absorptie van de lijm en een kleine ontsteking en verdikking van het hersenvlies.

3. Hutchinson et al gebruikte een mongrel dog repair model (n=27) (Hutchinson RW, Mendenhall V, Abutin RM, Muench T, Hart J. Evaluation of fibrin sealants for central nervous system sealing in the mongrel dog durotomy model. Neurosurgery 2011;69:921-8; discussion 9) in zijn studie om een fibrine lijm (Evicel)

te testen bij een durotomy gesloten met 6.0 prolene hechting met een 2 mm opening tussen de hechtingen. Dit was net zo effectief in het voorkomen van CSF lekkage als de lijmen Tisseel en Duraseal.

4. De Almeida et al (de Almeida JR, Ghotme K, Leong I, Drake J, James AL, Witterick IJ. A new porcine skull base model: fibrin glue improves strength of cerebrospinal fluid leak repairs. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141:184-9) gebruikte een varkensmodel om onderzoek te doen naar de beste methode om een lekkage te dichten. Ze hadden een fibrine lijm groep (n=9) en een controle groep (n=9). Naast de adequaatheid van het model toonde de fibrine lijm een verlaging van de CSF lekkage.

5. Ozisik et al (Ozisik PA, Inci S, Soylemezoglu F, Orhan H, Ozgen T. Comparative dural closure techniques: a safety study in rats. *Surg Neurol* 2006;65:42-7; discussion 7) vergelijkt in een rattenmodel 4 verschillende manieren om het hersenvlies te dichten en vergelijkt deze methoden met een controle groep. De fibrinelijm was het veiligste materiaal ondanks dat het risico op CSF lekkage groter was dan n- butyl cyanoacrylate (25% vs 12.5%). Deze studie toonde geen relatie tussen CSF lekkage en de histopathologische bevindingen van de eigenschappen van weefsellijmen

6. De Vries et al (de Vries J, Menovsky T, van Gulik S, Wesseling P. Histological effects of fibrin glue on nervous tissue: a safety study in rats. *Surg Neurol* 2002;57:415-22; discussion 22) heeft onderzoek gedaan naar de histologische effecten van fibrinelijm op de hersenen (n=12) en bij de trigeminal zenuw (n=12) in ratten. Het dichten was niet de primaire focus. In deze safety studie in ratten heeft de applicatie van fibrinelijm geen extra beschadiging van de hersenen of zenuwen veroorzaakt of littekenweefselvorming opgetreden.

Ondanks deze veelbelovende studies, is er nog steeds lekkage bij de huidige producten. Het theoretisch beste product ( ) laat de lekkage rate dalen, op zijn best van 17% naar 10% in klinische studies (Hutter et al Risk factors for postoperative CSF leakage after elective craniotomy and the efficacy of fleece-bound tissue sealing against dural suturing alone: a randomized controlled trial; *J Neurosurg*. 2014 Sep; 121(3):735-44. doi: 10.3171/2014.6.JNS131917. Epub 2014 Jul 18)

Wij hebben ook gekeken naar alternatieve producten die elders in het lichaam reeds gebruikt worden en eventueel voor durasealing in aanmerking komen. ( ) is de enige lijm die nu in Europa gebruikt wordt bij hersenvloeistof lekkage ( ) en die ook gebruikt wordt voor wondherstel in andere gebieden in het lichaam. Dit komt omdat de neurochirurgie een niche markt is voor de meeste fabrikanten, zij zullen niet snel hun producten überhaupt CE en FDA laten keuren specifiek voor neurochirurgie. Wij hebben toch een 3tal veelbelovende hemostatische producten getest in onze in vitro testen ( ) ( ) en ( ) werkte wel, ( ) niet. Verder zijn er geen producten naar onze kennis die in aanmerking komen, zeker niet omdat elders in het lichaam niet in waterige omstandigheden zonder bloed gewerkt dient te worden.

---

### 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 deze studie is om een nieuw ontwikkelde lijm dat de lekkage van hersenvloeistof voorkomt op levend weefsel te testen. Deze studie zal antwoord geven op de volgende vragen:

- Hoe ontwikkelt de lijm zich op levend weefsel?
- Treedt er lekkage van de hersenvloeistof op?
- Wat zijn de lange termijn effecten van de lijm op gehecht dura?
- Wat zijn de effecten van de lijm op het brein?



---

### 3.3 Belang

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

Het maatschappelijk belang is erg groot, aangezien lekkage van cerebrospinale vloeistof een van de meest voorkomende complicaties na een neurochirurgische ingreep is. Het aantal complicaties wordt geschat op 10-15% van alle intradurale operaties. Gemiddeld worden er zo'n 1500-2000 intradurale procedures per jaar gedaan in een gemiddelde neurochirurgische unit, dit komt neer op 150-200 patiënten per jaar. Van deze patiënten zullen er ongeveer 30-50 patiënten een nieuwe behandeling moeten ondergaan. Dit kan zijn dat ze een verlengde tijd in het ziekenhuis moeten blijven alleen ter observatie, een antibiotica behandeling moeten krijgen, een drainage of zelfs nog een keer geopereerd worden. Dit kan leiden tot ernstige invaliditeit of zelfs de dood. De kans dat je overlijdt aan de gevolgen van een dura lekkage zijn zeer klein gelukkig. In een studie in 2005 van Grotenhuis et al (Costs of postoperative cerebrospinal fluid leakage: 1-year, retrospective analysis of 412 consecutive nontrauma cases; Surg Neurol. 2005 Dec;64(6):490-3, discussion 493-4) is dit in 41 patiënten niet voorgekomen. Er is wel een hoge lijdensdruk (IC opnames, antibiotica, drains in de rug, hetroperatie) in deze 41 patiënten.

Wanneer er lekkage van cerebrospinale vloeistof optreedt zijn er complicaties zoals hoofdpijn door de verminderde CSF en kunnen er ontstekingen plaatsvinden. Voor de patient betekent dit dat er een verlengde tijd in het ziekenhuis is ter observatie en/of een antibiotica behandeling. Soms moet er een drainage worden geplaatst of zelfs opnieuw geopereerd. Wanneer het hersenvlies lekvrij kan worden gedicht is er een veel grotere kans op een snel herstel van de patient.

Het wetenschappelijk belang is ook groot. Er is erg weinig literatuur over het effect van lijmen op de sealing van dura. Er worden inmiddels wel al verschillende lijmen gebruikt. Deze zijn echter niet afdoende wetenschappelijk getest. Door dit nieuwe product wetenschappelijk zeer kritisch te testen zullen wij dit goed kunnen publiceren en dus potentieel de zorg rondom de patient verbeteren doordat we goede data hebben gegenereerd.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Dit project bestaat uit een in vitro en een in vivo gedeelte. Bij dit project werd er eerst in het lab een nieuw sealant ontwikkeld. Binnen ons instituut werd er vervolgens gestart met een drietal in vitro opstellingen om de grenzen van het nieuwe product te testen. De eigenschappen waaraan de lijm onder andere moet voldoen zijn minimale kracht, geen lekkage bij [REDACTED], flexibiliteit bij aanbrengen. De drie opstellingen bootsen elk een eigenschap na waar de lijm aan moet voldoen (minimale kracht, druk, etc.). Dit zorgt ervoor dat er in de in vitro experimenten verschillende prototypes op een kritische wijze zijn getest en er uiteindelijk 1 werkende lijm is overgebleven. Ter vergelijking werden er ook bestaande lijmen in de in vitro opstelling getest. Deze bestaande lijmen voldoen nog niet aan de gewenste eigenschappen, en sommigen bleken in het geheel niet te werken. Deze informatie wordt op dit moment verwerkt in een wetenschappelijk artikel. Alle laboratoriumexpimenten zijn uitgevoerd op hersenvlies van varkens welke gehaald zijn in consumptieslachthuizen.

[REDACTED]:

- [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]

[REDACTED]

Deel 2 van het project is het in vivo experiment. Dit is noodzakelijk om te kijken hoe het product zich op levend weefsel ontwikkelt. De biotransformatie, namelijk hoe een stof wordt afgebroken, wordt niet weergegeven in een in vitro opstelling. De stap van in vitro naar humaan zal anders te groot zijn. Alle dieren zullen een trepanatie ondergaan (lichten van het bovenste gedeelte van de schedel) en krijgen een [REDACTED] in de dura. Vervolgens wordt de dura weer gehecht en verstevigd met de lijm. Daarna wordt er voor een bepaalde periode (afhankelijk van de overlevingstijd) gekeken naar de fysiologische parameters en de lekkage bij de wond.

Het in vivo experiment zal starten met [REDACTED] varkens, met respectievelijk een overleving van [REDACTED] dagen, [REDACTED] week en [REDACTED] weken. Vervolgens zal aan de hand van de resultaten worden bepaald of de rest van de experimenten zal worden uitgevoerd. De experimenten bestaan in totaal uit [REDACTED] groepen met verschillende overlevingsduur: [REDACTED] dagen, [REDACTED] week, [REDACTED] weken, [REDACTED] maand, [REDACTED] maanden en [REDACTED] maanden. De [REDACTED] groepen bestaan elk uit [REDACTED] varkens wat neerkomt op [REDACTED] varkens geopereerd worden.

De [REDACTED] varkens per overlevingsduur ondergaan de volgende operaties:

- [REDACTED] varkens krijgen een bilaterale lineaire incisie in de dura, de incisie wordt gehecht en daarna wordt de lijm over de incisie geapliceerd. (testgroep)
- [REDACTED] varkens krijgt een bilaterale lineaire incisie in de dura, de incisie wordt gehecht. (controle)
- [REDACTED] varken krijgt een bilaterale circulaire incisie in de dura en daarna wordt de lijm over de incisie geapliceerd. (effect van direct contact van de lijm op het brein)

De bovenstaande [REDACTED] varkens worden allemaal getest met het nieuwe product. Uit de in vitro studie is gebleken dat [REDACTED] al bestaande producten zich goed verhouden in de in vitro opstellingen ([REDACTED]). Deze [REDACTED] producten willen we als een controle groep meenemen in de reeks. Van [REDACTED] producten willen we [REDACTED] dieren toevoegen met een overlevingstijd van [REDACTED] dagen, [REDACTED] weken en [REDACTED] maanden. Dit komt uit op [REDACTED] extra varkens voor de al bestaande producten.

Daarnaast willen we [REDACTED] reserve dieren aanvragen, wat het totaal op [REDACTED] brengt.

Deze overlevingstijden zijn gekozen om het verloop van de resorptie van het product en de durale regeneratie te kunnen bekijken. De eerste dagen en weken zijn kortere intervallen omdat de huid nog niet dicht is en het sealant gedrag van het product essentieel is. Het vormen van een liquorpocket epiduraal of subcutaan is hierbij essentieel. De resorptie en eventueel ontstekingsreacties zijn ook zeer belangrijk. Na [REDACTED] weken breiden we de survival groepen langzaam uit. De langere overleving is gekozen omdat we willen weten wat er teruggroeit in de plaats van het resobeerbare product en hoe dit weefsel zich over de tijd handhaaft. Dit zal erg belangrijk zijn ook in de acceptatie van gebruikers en CE/FDA.

De periode na de operatie wordt er op een vooraf bepaald interval (dag 1,3,7 en dan eerste maand om de week, daarna iedere maand, afhankelijk van de overlevingsduur) bloed afgenomen om verschillende parameters te controleren.

Als de overlevingstijd erop zit zal er vlak voor terminatie onder anesthesie een MRI scan worden uitgevoerd ter controle. De MRI wordt gedaan om te kijken of er een liquorpocket onder de botlap of onder de huid aanwezig is. Histologisch is dit niet te analyseren, aangezien het eventuele liquorpocket lek gaat bij openen van het dier en er geen bewijs meer is. Echo is ongeschikt om onder het bot te kijken. Bovendien moeten we weten hoe het product er over tijd uitziet op MRI voordat we het product plaatsen in een patient. Na de MRI wordt er vlak voor termineren na verwijderen van de botlap nog een test gedaan, de druk in het brein wordt verhoogd via een epidurale catheter om te kijken of er enige lekkage ontstaat. Vervolgens wordt het varken geëuthaniseerd en wordt het brein en dura eruit gehaald voor histologisch onderzoek. De dura van een zijde van 3 varkens per subgroep zal nogmaals in de in vitro opstelling worden geplaatst om acute data te verkrijgen.

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 Landrace varken van 70-80 kg worden gebruikt. Het schedeldak wordt gelift en het hersenvlies komt bloot te liggen. Deze wordt geopend en daarna door middel van een sealant gerepareerd. Voor de studie zijn er ■ subgroepen met ■ voor het nieuwe product en ■ subgroepen voor de ■ al bestaande lijmen met ■. Het totaal komt hierbij dus op ■ varkens.

De ■ subgroepen zijn ingedeeld naar overlevingstijd:

- ■ dagen
- ■ week
- ■ weken
- ■ maand
- ■ maanden
- ■ maanden

De ■ varkens per subgroep ondergaan de volgende operaties:

- ■ krijgen een bilaterale lineaire incisie in het hersenvlies, de incisie wordt gehecht en daarna wordt de lijm over de incisie op de dura geapliceerd. (testgroep)
- ■ krijgen een bilaterale lineaire incisie in de dura, de incisie wordt gehecht. (negatieve controle)
- ■ krijgt een bilaterale circulaire incisie en daarna wordt de lijm over de incisie geapliceerd. (effect van direct contact van de lijm op het brein)

De 6 varkens voor de ■ subgroepen (■ dagen, ■ weken en ■ maanden) voor de ■ al bestaande lijmen ondergaan allen een ■ incisie in het hersenvlies. De incisie wordt gehecht en daarna wordt er lijm over de incisie op de dura geapliceerd.

---

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

---

Er wordt gestart met ■ varkens die respectievelijk ■ dagen, ■ week en ■ weken zullen overleven. Na deze ■ varkens is er een Go/No Go moment. Potentiele No Go redenen zijn: het overlijden van een varken, een lekkage bij meer dan 1 varken, infectie in de vorm van abces/empyeem bij meer dan 1 varken, groter ongerief dan van tevoren ingeschat van de dieren na de operatie. Een onafhankelijk dierenarts zal de dieren controleren na de experimenten en het vooraf ingeschatte ongerief (matig) vergelijken met het daadwerkelijke ongerief. Er zal op het moment van No Go eerst verder in vitro onderzoek moeten volgen. Bij een Go zullen in principe de resterende ■ dieren worden geopereerd. Echter, indien er zich een ernstige complicatie voordoet (overlijden van een dier of gedwongen euthenasie voor de geplande terminatie door ernstig ongerief of door lekkage uit de wond) zal er een herevaluatie plaatsvinden, mede bepaald door het oordeel van een onafhankelijke dierenarts.

---

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Dura lekkage testen in varkens
2	
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Dura lekkage testen in varkens</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Dura lekkage testen in varkens
Volgnummer	Type dierproef					
1	Dura lekkage testen in varkens					

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het experiment is opgebouwd uit een studie van ■ dieren. We hebben veel ervaring met het varken als proefdier. Het varken is in eerdere studies gebruikt. De manier van het vrijleggen van de dura bij een varken is door de uitvoerende geoefend bij een neurochirurgische training waarbij het trainingsmodel een varken was.

Omdat het onderzoek nog niet eerder is uitgevoerd, wordt er eerst ■ varkens geopereerd. Na deze ■ experimenten zal er een go/no go besluit plaatsvinden.

De primaire uitkomstparameters zijn:

1. postoperatieve CSF lekkage uit de wond

2. liquorpocket op MRI
3. Infectie op MRI
4. Infectie histologisch
5. adherentie histologisch en mogelijke infectie.

Standaard welzijnslogboek wordt ingevuld voor de volgende parameters: temperatuur, gewicht, hartslag, wondinspectie, ademhaling, voedselinname

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

1. Het varken wordt onder anesthesie gebracht.
2. Incisie op de middenlijn van de kop.
3. Er wordt een trepanatie van [REDACTED] gedaan.
4. Twee [REDACTED] in de dura links en rechts van de sinus sagittalis superior. Deze worden gehecht en gelijkmd. Bij het controle dier worden er twee [REDACTED] gemaakt die worden gehecht en niet gelijkmd. De derde groep krijgt een [REDACTED] waarna de lijm over de incisie wordt geapliceerd. Bij de controlegroep met de al bestaanden producten worden er lineaire incisies in de dura links en rechts van de sinus sagittalis gemaakt, deze worden gehecht en gelijkmd met een al bestaand product.
5. Incisies worden gehecht en eventueel verstevigd met de lijm.
6. De botlap wordt teruggeplaatst en gefixeerd met [REDACTED] hechtingen.
7. De subcutis wordt met losse [REDACTED] hechtingen dichtgemaakt met [REDACTED] mm afstand, de opperhuid met doorlopende [REDACTED]).
8. Het dier wordt op OK wakker gemaakt en indien er geen respiratoire stress is wordt het dier in een verblijf gelegd.
9. Overlevingstijd verschilt per dier ([REDACTED] dagen, [REDACTED] week, [REDACTED] weken, [REDACTED] maand, [REDACTED] maanden, [REDACTED] maanden).
10. Voor terminatie wordt het dier opnieuw onder anesthesie gebracht
11. Er wordt vlak voor terminatie een MRI verricht
12. De druk in het brein wordt verhoogd om te kijken of er enige lekkage ontstaat
13. Het dier wordt op OK van het GDL getermineerd, hersenen worden inclusief dura verwijderd.
14. [REDACTED] en er vindt histologische analyse van het weefsel plaats.

Elke stap wordt eenmalig uitgevoerd, de duur van de operatie wordt geschat op 2 uur, duur van de MRI en daarna terminatie wordt geschat op 4 uur.

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

Eerdere experimenten in vitro door ons toonden burst pressure van de dura gehecht en geseald met lijm van [REDACTED], en van enkel gehechte dura [REDACTED]. Als we dit vergelijken met spaarzame literatuur zijn dit reelee getallen. De UBC online sample size calculator (<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>), met Alpha 5% en Beta 90% komt op [REDACTED] varkens per subgroep, dus [REDACTED] dieren met gehechte gesealde dura en [REDACTED] dieren met enkele gehechte dura, om dit verschil aan te tonen. We includeerde [REDACTED] extra varken om te corrigeren voor een potentiële overschatting van het verschil. Bovendien dient gecontroleerd te worden wat direct contact van het brein met de lijm oplevert. Hiervoor includeren we [REDACTED] dier per subgroep. Tevens voegen we [REDACTED] dieren toe ter verificatie met al bestaande lijmen. Er worden [REDACTED] al bestaande producten getest met elk [REDACTED] dieren, [REDACTED] per overlevingstijd ([REDACTED] dagen, [REDACTED] weken en [REDACTED] maanden) per bestaand product. Eerdere experimenten met varkens in een ander protocol leerde ons dat varkens gevoelig zijn voor anesthesie en hieraan kunnen overlijden. Indien dit gebeurt excluderen wij dit dier en zullen een nieuw dier opereren. Wij vragen dus [REDACTED] dieren aan, maar

zullen hopelijk slechts ■ dieren hoeven te bestellen en daadwerkelijk te opereren.

## B. De dieren

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

Female Dutch Landrace pigs, afkomstig van een Varkensfokkerij in Nederland. Het varken heeft een hersenvlies die sterk gelijkend is aan het hersenvlies van de mens. Voor deze studie zullen ■ varkens worden gebruikt. De afzet van de dieren vindt plaats in het reguliere productiekanaal.

Voor deze studie zijn er ■ tijdsgroepen: ■ dagen, ■ week, ■ weken, ■ maand, ■ maanden en ■ maanden. ■ tijdsgroepen hebben ■ varkens (inclusief controlegroepen) dit zijn: ■ . Drie tijdsgroepen hebben ■ varkens, dit in verband met het testen van de al bestaande lijmen bij de subgroepen ■ dagen, ■ weken en ■ maanden. Daarnaast willen we ■ varkens extra aanvragen indien er iets gebeurt waardoor we een dier moeten excluseren. Er is gekozen voor vrouwtjes omdat die makkelijk samen te huisvesten zijn. De varkens worden geopereerd bij een gewicht van 70-80kg. Dit komt overeen met het gewicht van de slachthuis dieren waarvan de dura gebruikt is. Uit een kleine histologische studie is de dura van mensen vergeleken met de dura's van ■ verschillende dieren. Uit deze studie is gebleken dat de dura van het varken het meest vergelijkbaar is met die van de mens. Deze dura is histologisch geanalyseerd en als model geschikt bevonden. Uiterlijk 2 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.

Met de in vitro opstellingen is sterk gelet op de vervanging, vermindering en verfijning. Er wordt al rekening gehouden met vervanging omdat we geen proefdieren gebruiken voor de preselectie. Bovendien hebben we de operatie met alle instrumenten die hiervoor gebruikt dienen te worden reeds uitgebreid geoefend op varkenskoppen uit het slachthuis. Vermindering aangezien we de dura's voor de eerdere in vitro experimenten bij een slachthuis verkregen en verfijning omdat met deze opstellingen al werd bewezen dat het principe van de te testen lijm werkt. Tijdens de in vivo experimenten wordt er ook rekening gehouden met de drie V's. Vervanging is in dit geval niet mogelijk aangezien het varken het meest lijkende model (qua dura en hersenstructuur) is in verhouding met de mens. Bovendien is deze operatie in kleinere dierenhoofden technisch zeer complex. Voor vermindering is er een statistische berekening uitgevoerd. Er is berekend hoeveel varkens er nodig zijn om variatie uit de sluiten en toch zo min mogelijk dieren nodig te hebben. Ook wordt er gelet op verfijning. De procedure wordt namelijk alleen uitgevoerd door zeer getrainde personen (de operateur is neurochirurg) zodat er zo min mogelijk trauma voor

het dier is.

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

De dieren krijgen tijdens de gehele procedure anesthesie. Na openen van de huid zal er lidocaine op het periost worden gedruppeld. De pijnstilling begint op dag-1 en deze blijft 5 dagen zitten. Antibiotica zal pre-operatief worden gegeven en de daarna 2 volgende dagen. De dieren zullen postoperatief individueel worden gehuisvest totdat de wond dicht is. Daarna zullen we de dieren in groepen huisvesten in mooie 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.

Het te testen product is een nieuw ontwikkelde lijm en is dus nog niet eerder uitgevoerd. Andere producten zijn vaak direct op mensen getest, of dierproeven zijn niet gepubliceerd. Naar ons beste weten is dit model enkel voor trainingen gebruikt, niet voor wetenschappelijke doeleinden.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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



Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er kan ongerief plaatsvinden doordat er bloedmonsters moeten worden afgenomen, de wond zal moeten worden geïnspecteerd en er zal bekeken worden of er CSF lekkage is opgetreden

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Een oorzaak van deze verschijnselen zullen allen te wijten zijn aan de operatie.

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

Er zullen bloedmonsters worden afgenomen (met reguliere intervallen) om verschillende parameters te controleren (infectie, stolling electrolyten huishouding) In het algemeen zullen temperatuur, hartslag, wondinspectie, ademhaling, voedselinname dagelijks genoteerd worden. Het gewicht zal wekelijks genoteerd worden. Bij twijfel zal een onafhankelijk dienstdoende dierenarts van het GDL geraadpleegd worden die voor start van de experimenten op de hoogte gebracht zal zijn en zijn fiat dient te hebben gegeven.

Tevens wordt de 1.5 Tesla MRI gebruikt om eventuele lekkage of infecties bij de dura te kunnen zien.

### **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 eindpunt wordt bereikt bij optreden van:
- -Ernstige lekkages door operatielitteken; ernstig onwelbevinden/ondraaglijk lijden/slapte/eetlustvermindering
- -Cerebrale complicaties (verlamming); diagnose wordt in de stal gesteld, waarna overleg met dierenarts.
- -Bij postoperatieve ontsteking/infectie/temperatuurstijging: intercurrente infectie in overleg met dierenarts aangepaste antibiotica. Wanneer geen verbetering na 72 uur of ondraaglijk lijden in overleg met dierenarts.
- -Ernstig verminderd beweeggedrag/ teruggetrokken sociaal gedrag
- -Geen eetgedrag na 48 uur
- -Geen drinkgedrag na 36 uur
- -lijden van het dier, dit ter beoordeling aan art. 12 (dierverzorger), proefdier deskundige en veterinaire GDL
-

Bij het bereiken van een humaan eindpunt zal het dier onder anesthesie gebracht worden. Er zal eerst een MRI gemaakt worden, daarna zal het dier getermineerd worden volgens het normale protocol. Indien dit niet mogelijk is zal direct overgegaan worden tot euthanasie m.b.v. euthanasaat.

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

Wij schatten in dat er [ ] dieren door perioperatieve complicaties kunnen overlijden die niet direct veroorzaakt zijn door de specifieke operatie, maar door algemene narcose (bv intubatie of gevoeligheid voor bepaalde middelen) Derhalve vragen wij [ ] extra dieren aan. 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 > Ga verder met de ondertekening.

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

Om te onderzoeken wat de werking van de lijm is, is het noodzakelijk om de wond weer te openen en te kijken of de werking van de lijm is zoals verwacht. Verder zijn het brein en de dura nodig voor nader onderzoek. Het brein is nodig voor histologische analyse en de dura met lijm zal opnieuw in een in vitro opstelling worden getest.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.I.545.018
2. Titel van het project : Feasibility study new dural sealant
3. Titel van de NTS : Veiligheid en effectiviteit van een lijm om het hersenvlies te dichten

## 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: 26-10-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 04-11-2015 en 02-12-2015  
 anderszins behandeld: per mail: 06-01-2016 en 27-01-2016  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 09-11-2015 tot 20-11-2015  
09-12-2015 tot 06-01-2016  
22-01-2016 tot 27-01-2016  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 02-03-2016

## 7. Eventueel horen van aanvrager

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

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 09-11-2015
- Strekking van de vragen:  
Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert u om de passage waarin u het te besparen geldbedrag noemt, weg te laten. Uw doel is niet geld te besparen, maar de complicaties bij de patiënten voorkomen. Dat dit ook een besparing oplevert is niet meer dan een welkome bijkomstigheid en nauwelijks relevant voor de vraag of deze dierexperimenten ethisch toelaatbaar zijn.
- 3.2 Doel: De DEC vraagt zich af waarom u een vergelijking met het beste product dat op dit moment al gebruikt wordt achterwege laat en verneemt graag de redenen daarvoor.
- 3.3 Belang: Ook hier adviseert de DEC u om, net als in 3.1, de verwijzing naar de kostenbesparing die bereikt kan worden achterwege te laten of in elk geval veel minder te benadrukken.

#### Bijlage 1:

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af wat het doel van de pilot is. Wat wordt er met de uitkomsten van de pilot gedaan en wat zouden die uitkomsten nog kunnen veranderen aan de opzet van de proef? De DEC ziet het als een zwak punt dat er geen vergelijking wordt gemaakt tussen uw nieuwe lijm en een reeds op de markt zijnde lijm die ook vaak voor dit doel wordt gebruikt. De DEC ziet geen goede redenen om dat pas te doen in een klinische trial bij mensen.
- J. Humane eindpunten: De DEC vindt ondraaglijk lijden als criterium voor een humaan eindpunt niet aanvaardbaar. Humane eindpunten zijn er om te voorkomen dat de dieren ondraaglijk lijden. De DEC verzoekt u dit weg te laten of een andere formulering te kiezen.

#### Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: De DEC adviseert u om het kostenaspect ("bovendien duur voor het ziekenhuis") niet in één adem noemen met de complicaties bij de patiënt (bij voorkeur weglaten). Uw primaire doel is niet geld te besparen, maar de complicaties te voorkomen. Dat dat ook een besparing oplevert is niet meer dan een welkome bijkomstigheid.

- Datum antwoord: 20-11-2015
- Strekking van de antwoorden:

#### Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De onderzoekers zien de besparing die dit product kan voorkomen als een bijkomstig voordeel voor het financiële en politieke klimaat waar Nederland zich tegenwoordig in bevindt. Uiteraard zullen de onderzoekers de kostenbesparing minder benadrukken en alleen vermelden als bijkomstig voordeel. Alle passages waarin de kostenbesparing wordt vermeld zullen worden aangepast in het projectvoorstel en de niet technische samenvatting.
- 3.2 Doel: 1. Geen van de reeds op de markt zijnde producten voldoen in onze in vitro resultaten volledig. Indien u dat wenst zijn de data beschikbaar ter inzage.



3. [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED].

- 3.3 Belang: Zie antwoord welke gegeven is bij 3.1 achtergrond

Bijlage 1:

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Naar aanleiding van de opmerkingen van de IVD is er een pilot groep toegevoegd aan het protocol. In eerste instantie was het protocol zo geschreven dat er na de eerste [REDACTED] dieren een go/no go moment zou zijn om te besluiten over het verdere verloop van de studie. Er zijn [REDACTED] extra dieren toegevoegd omdat een pilot niet mag worden geïncorporeerd in de testgroep. Deze toevoeging kunnen we indien u wenst herzien. We willen dan dus na de eerste [REDACTED] dieren een go/no go moment inlassen en aan de hand van de resultaten bepalen of de testgroep verder zal gaan. Het woord 'pilot' is hier ook niet echt van toepassing.
- J. Humane eindpunten: Het ondraaglijk lijden als criterium voor een humaan eindpunt zal worden verwijderd uit het DEC verzoek.

Niet Technische Samenvatting:

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: Zie antwoord welke gegeven is bij 3.1 achtergrond

- Datum: 09-12-2015

- Strekking van de vraag:

Projectvoorstel

- 3.2, doel: De DEC verzoekt u een korte samenvatting te geven van de methodes en resultaten van de door u genoemde in vitro-proeven, waaruit blijkt dat het geen zin heeft om een vergelijking uit te voeren met een reeds bestaande stof. Mocht dit niet blijken uit uw resultaten, dan ziet de DEC toch graag een controlegroep voor een beperkte vergelijking met de reeds bestaande best werkende lijm, waarbij bijvoorbeeld [REDACTED] maanden lang [REDACTED] varkens gevolgd zullen worden.

- Datum antwoord: 06-01-2016

- Strekking van het antwoord:

De onderzoeker beoogt een gunstig effect te zien bij een vergelijking met een bestaand product. Mede om het bestaande product als verificatie groep te kunnen gebruiken. De resultaten zijn in vitro gehaald [REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

Daarna hebben we een lange termijn test gedaan waarbij producten 3 dagen werd geapliceerd op verse varkens dura met een gestandaardiseerde opening en daaronder een fysiologische druk curve van het brein. Enkel het nieuw te testen product weerstond deze test condities. Dit is zorgwekkend, maar het blijft uiteraard een in vitro omgeving. Daarom hebben na enkele overwegingen mede op uw terecht advies toch besloten de relatief beste en meest gebruikte producten te includeren in deze studie. ■■■■■ s wordt weinig gebruikt, met name in trial verband en experimenteel. Daarom zien we geen noodzaak dit product te includeren. ■■■■■ wordt veelal gebruikt ■■■■■ ziekenhuizen en ■■■■■ wordt vooral op de ■■■■■ markt gebruikt. Dit zijn de ■■■■■ producten die het best presteren. Om deze redenen willen we deze ■■■■■ typen producten graag toevoegen aan de te testen groepen. We willen per product ■■■■■ dieren toevoegen met een overlevingstijd van ■■■■■ dagen, ■■■■■ weken en ■■■■■ maanden.

- Datum: 22-01-2016
- Strekking van de vragen:
  - Onder 3.2 beschrijft u "toxicologische proeven" door derden, in de aanvraag wordt hier verder geen vervolg aan gegeven. De DEC vraagt zich af of deze zin komt te vervallen.
  - Verder geeft u aan dat een onafhankelijke dierenarts het ongerief gaat beoordelen, de DEC vraagt zich af wie de onafhankelijke dierenarts is.
  
- Datum antwoord: 27-01-2016
- Strekking van de antwoorden:
  - Deze zin komt te vervallen.
  - De onafhankelijke dierenarts zal de dienstdoende dierenarts van het GDL zijn
  
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

#### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

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

### **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Het doel van dit project is om de werking van een nieuw *in vitro* ontwikkeld product *in vivo* te toetsen. Het product is een lijm die gebruikt zou kunnen worden bij het dichten van de dura mater (het buitenste vlies van de hersenen en ruggenmerg) na een neurochirurgische ingreep. Daarnaast wordt getoetst of eventuele (lange termijn) effecten van de lijm op de hersenen en de dura mater waarneembaar zijn. Dit onderzoek is van belang, omdat in sommige gevallen, zoals een langdurige operatie of een hoge leeftijd van de patiënt, de dura mater niet volledig gesloten kan worden na een operatie. Het niet volledig dichten van de dura mater, wat leidt tot lekkage van het cerebrospinale vloeistof, is een van de meest voorkomende complicaties na een neurochirurgische ingreep. Deze complicatie kan ernstig van aard zijn wanneer er bijvoorbeeld een ontsteking optreedt, een drainage moet worden geplaatst, of de patiënt nogmaals geopereerd moet worden. Door het dichten van de dura mater met deze lijm zouden in de toekomst complicaties kunnen worden voorkomen. Er bestaat hiervoor nog geen geregistreerd product. Desondanks worden enkele producten, in de hoop om complicaties te voorkomen, al wel in de praktijk gebruikt. Uit enkele wetenschappelijke studies naar de werkzaamheid van de nu gebruikte producten blijkt dat er nog steeds lekkage optreedt. De DEC acht het van belang dat er een bewezen werkzaam product, dat speciaal voor deze toepassing is ontwikkeld, beschikbaar komt.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De opzet van het project is logisch en helder beschreven. Om het verloop van de resorptie van het product, de regeneratie van de dura mater en eventuele infecties te onderzoeken, wordt de locatie van de incisie op [REDACTED] verschillende tijdstippen na de operatie onderzocht (van enkele dagen tot maanden). Dit wordt gedaan door middel van een MRI scan onder anesthesie en histologisch onderzoek. Het onderzoek wordt gestart met [REDACTED], waarna er een Go/No Go moment plaatsvindt. Potentiele No Go redenen zijn: het overlijden van een varken, een lekkage van de wond bij meer dan één varken, infectie in de vorm van abces/emfyseem bij meer dan één varken of een groter ongerief dan van tevoren ingeschat als gevolg van de anesthesie en operatie. Bij een Go zullen de resterende dieren worden geopereerd waarbij tussentijds herevaluaties zullen plaatsvinden indien zich een ernstige complicatie voordoet bij een dier.

De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Dit onderzoek is een vervolg op eerder uitgevoerd *ex vivo* onderzoek door dezelfde onderzoeksgroep. Tijdens het *ex vivo* onderzoek is uitvoerig gewerkt met de dura mater van het varken uit slachthuismateriaal en is de manier van het vrij leggen van de dura mater geoefend bij een neurochirurgische training waarbij het trainingsmodel een varken was. Het *ex vivo* onderzoek heeft geleid tot een nieuw product, wat de onderzoekers in de huidige projectaanvraag *in vivo* willen toetsen. Daarnaast hebben de onderzoekers tijdens het *ex vivo* onderzoek ook twee andere producten getoetst, die al in de praktijk worden gebruikt (■■■■■). De onderzoekers zullen in de *in vivo* experimenten het nieuwe product vergelijken met deze twee bestaande producten.

5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt door de onderzoekers als matig ingeschat. Dit ongerief is het gevolg van een eenmalige twee uur durende hersenoperatie onder anesthesie. Afhankelijk van de experimentele groep zal het dier na een aantal dagen, weken of maanden opnieuw onder anesthesie worden gebracht om een MRI-scan van de kop te maken. Vervolgens wordt het dier gedood en worden de hersenen inclusief dura mater verwijderd. De duur van de MRI-scan wordt geschat op vier uur. Na de scan worden de dieren gedood zonder nog bij te komen uit de anesthesie. Het totale ongerief van alle dieren (100%) wordt door de DEC als matig geclassificeerd. De humane eindpunten zijn duidelijk beschreven. De onderzoekers geven aan dat mogelijk (■■■■■) (2-5%) door perioperatieve complicaties die niet direct veroorzaakt zijn door de specifieke operatie, maar door algemene narcose, kunnen overlijden. De DEC is van mening dat dit soort complicaties voorkomen kan worden en adviseert de onderzoekers dan ook dringend om contact op te nemen met een expert op het gebied van anesthesie.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In het huidige project wordt onderzocht of de lijm werkzaam is op levend weefsel en hoe de levende hersenen en hersenvliezen op de lijm reageren. Daarnaast moet worden



getoetst wat de eventuele lange termijn effecten van de lijm op de weefsels zijn. Hoe de lijm functioneert, en hoe de hersenen en hersenvliezen reageren op de lijm kan niet worden onderzocht in een *in vitro* opstelling, cel systeem of met een wiskundig computermodel. De onderzoekers hebben de hersenvliezen van verschillende diersoorten met elkaar vergeleken. Deze bleken qua samenstelling behoorlijk verschillend. Voor dit onderzoek wordt het varken als proefdier gebruikt omdat de dura mater van het varken goed vergelijkbaar is met de dura mater van de mens. De onderzoeker heeft de operatie met alle instrumenten die hiervoor gebruikt dienen te worden reeds uitgebreid geoefend op materiaal uit het slachthuis.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Door te werken met slachthuismateriaal hebben de onderzoekers in voorafgaande experimenten substantieel bijgedragen aan de vermindering van het aantal proefdieren. Tijdens deze *ex vivo* experimenten hebben de onderzoekers meerdere lijmen getest en hieruit is een selectie gemaakt voor de *in vivo* experimenten. De ervaringen en datapunten verkregen uit deze *ex vivo* experimenten zijn vergeleken met andere wetenschappelijke studies en blijken volgens verwachting te zijn. De onderzoekers hebben de data uit de *ex vivo* experimenten gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen voor het huidige *in vivo* project. In aanvulling op het hieruit berekende aantal dieren willen de onderzoekers controleren wat het effect is van de lijm op de hersenen wanneer geen hechtingen worden gebruikt om de dura mater te dichten. Hiervoor wordt één dier per subgroep (de levensduur) gebruikt. Het gebruik van uitsluitend vrouwelijke dieren leidt in dit geval niet tot een fokoverschot, omdat de varkens worden aangekocht van reguliere varkensfokkers. De DEC is van mening dat het maximaal aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De varkens worden uiterlijk twee weken voor start van de procedure besteld, zodat er voldoende tijd is voor acclimatisatie. De onderzoekers gebruiken vrouwelijke varkens uit de reguliere productie, omdat deze goed in groepsverband gehuisvest kunnen worden. Ongerief ten gevolge van pijn na de operatie wordt door middel van pijnbestrijding voorkomen of verlicht. De operatie zal worden uitgevoerd door een neurochirurg zodat de duur van de operatie en de trauma van de wond worden geminimaliseerd. De onderzoekers hebben door eerder uitgevoerde studies veel ervaring met experimenten met varkens en nemen adequate voorzorgsmaatregelen voor eventuele problemen. Daarnaast worden de dieren dagelijks gemonitord en worden ze in groepen gehuisvest in hokken met omgevingsverrijking. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

## **D. Ethische afweging**

Op grond van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende afweging. Het beschreven project is een toegepast onderzoek met als doelstelling het ontwikkelen van een lijm waarmee de dura mater kan worden gedicht na een neurochirurgische ingreep. Een lekkage van de dura mater is een van de meest voorkomende complicaties in de neurochirurgie en kan ernstige gevolgen hebben voor de patiënt. De uitkomsten van dit onderzoek dragen substantieel bij aan de ontwikkeling van een werkzame en veilige lijm. De DEC is van mening dat het projectvoorstel vanuit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is. Bovendien wordt de vertaling van de onderzoeksresultaten naar de mens mogelijk geacht, waardoor in de toekomst complicaties kunnen worden voorkomen. De gestelde doeleinden kunnen worden gehaald binnen de gevraagde termijn. De onderzoeksgroep heeft ervaring met de beschreven diermodellen. De DEC acht, alles overziend, het belang van dit onderzoek daarom substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren (100%) matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de anesthesie en operatie, de dagelijkse controles en het herhaaldelijk afnemen van bloed. De DEC is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van dierenwelzijn en vermindering van ongerief. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

Het onderzoek is gebaseerd op een eerdere validatie van de de testproducten (lijm) in in vitro proeven. De bestijging van deze bevinding in een dierproef is een noodzakelijke stap om elk risico voor de toepassing bij mensen (patiënten) zeker uit te sluiten. De projectaanvraag voldoet aan de eisen op het gebied van vervanging vermindering en verfijning van dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> 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  
AVD115002016457

**Bijlagen**

2

Datum 9 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016457. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 april 2016  
Geplande einddatum: 1 juni 2018  
Titel project: Feasability study new dural sealant  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de veiligheid en werkzaamheid van lijm om het hersenvlies te dichten  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Utrecht  
Datum: 3 maart 2016



> 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  
AVD115002016457  
**Bijlagen**  
2

Datum 9 maart 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 9 maart 2016  
Vervaldatum: 8 april 2016  
Factuurnummer: 16700457  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002016457	€ 935,00

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



**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 19 april 2016 15:51  
**Aan:** [Redacted]  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** Aanvulling AVD115002016457

Geachte meneer, mevrouw,  
 Op 7 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Feasability study new dural sealant" met aanvraagnummer AVD115002016457. Over deze aanvraag hebben wij een vraag.

In het projectvoorstel en de Bijlage Dierproeven staan berekeningen voor het benodigde aantal dieren. Deze berekeningen zijn echter niet eenduidig te volgen. Kunt u een duidelijke berekening maken voor het aantal aan te vragen dieren?

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze e-mail op. U kunt dit aanleveren via e-mail.

Als u de informatie uiterlijk 21 april aanlevert, kan uw aanvraag de aankomende vergadering van de CCD behandeld worden.

**Wanneer een beslissing**

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

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,



**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
 T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



## Toelichting groeps grootte berekening bij aanvraag AVD115002016457

Originele tekst: *Eerdere experimenten in vitro door ons toonden burst pressure van de dura gehecht en geseald met lijm van [REDACTED], en van enkel gehechte dura [REDACTED]. Als we dit vergelijken met spaarzame literatuur zijn dit reële getallen. De UBC online sample size calculator (<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>), met Alpha 5% en Beta 90% komt op [REDACTED] varkens per subgroep, dus [REDACTED] dieren met gehechte gesealde dura en [REDACTED] dieren met enkele gehechte dura, om dit verschil aan te tonen. We includeerde [REDACTED] extra varken om te corrigeren voor een potentiële overschatting van het verschil. Bovendien dient gecontroleerd te worden wat direct contact van het brein met de lijm oplevert. Hiervoor includeren we [REDACTED] dier per subgroep. Tevens voegen we [REDACTED] dieren toe ter verificatie met al bestaande lijmen. Er worden [REDACTED] al bestaande producten getest met elk [REDACTED] dieren, [REDACTED] per overlevingstijd [REDACTED] dagen, [REDACTED] weken en [REDACTED] maanden) per bestaand product. Eerdere experimenten met varkens in een ander protocol leerde ons dat varkens gevoelig zijn voor anesthesie en hieraan kunnen overlijden. Indien dit gebeurt excluderen wij dit dier en zullen een nieuw dier opereren. Wij vragen dus [REDACTED] dieren aan, maar zullen hopelijk slechts [REDACTED] dieren hoeven te bestellen en daadwerkelijk te opereren.*

### Toelichting:

Er zijn geen eerdere dierproeven gedaan met varkens en dural sealants naar ons beste weten. Wij verrichtten ter voorbereiding en ontwikkeling reeds veel metingen (n=783) in het lab op verse kadaver dura van varkens met verschillende sealants. Wij maakten hiervoor een speciale setup. [REDACTED] Een dura die gestandaardiseerd geopend werd en geseald met de nieuwe sealant toonde een weerstand tegen vloeistofdruk van gemiddeld [REDACTED]. De maximale vloeistofdruk van geopende, gehechte, en niet gesealde dura is in vitro lager, [REDACTED].

Wij zijn van plan een druktest uit te voeren in het varken vlak voor terminatie, vlak na de controle MRI. Praktisch gezien wordt dus het varken bij terminatie onder anesthesie gebracht in de stal, vervoerd naar de MRI, daarna vervoerd naar de OK alwaar we een canule cervicaal intraduraal brengen na anesthesie, en zal de druk opgevoerd worden. Er wordt dan gekeken wanneer een lekkage optreedt. De sample size om het verschil aan te tonen tussen een verwachte maximale druk van [REDACTED] mmHg versus [REDACTED] mmHg is laag. Als we de sample size uitrekenen geeft dit [REDACTED] varkens, met Alpha 2,5% en Beta 90%. Dat wil dus zeggen dat we per survival groep [REDACTED] varken zouden moeten opereren zonder lijm [REDACTED] en [REDACTED] varkens geseald ([REDACTED]). Na overleg besloten we een [REDACTED] geseald varken per subgroep toe te voegen. Dit compenseert voor een potentiële onderschatting van het verschil tussen de gesealde en niet gesealde dieren. Bovendien is het wetenschappelijk gezien betrouwbaarder om [REDACTED] gesealde dieren te hebben. Als [REDACTED] dieren [REDACTED] verschillende objectieve waarnemingen betreffende de sealant bieden op MRI of histologisch, zal een [REDACTED] van grote toegevoegde waarde zijn. Er zal daarnaast nog een [REDACTED] dier per overlevingsgroep geïnccludeerd worden waarbij de dura cirkelvormig in plaats van lineair geopend wordt ([REDACTED] en de sealant direct op het brein gelegd wordt. ([REDACTED] Het is

belangrijk dat dit dier geïncubeerd wordt omdat we de reactie van cerebrale cortex op de sealant willen zien in de tijd. In totaal zullen dus [redacted] dieren per survival groep geopereerd worden. We zullen groepen met overlevers van [redacted] dagen, [redacted] dagen, [redacted] weken, [redacted] maand, [redacted] maanden en [redacted] maanden opereren, dit zijn in totaal dus [redacted] subgroepen met in totaal [redacted] dieren. Voorts zullen we aan [redacted] subgroepen controle lijmen toevoegen, dat wil zeggen dat aan ieder van de [redacted] dagen, [redacted] dagen en [redacted] maanden groep [redacted] varken toegevoegd wordt geseald met [redacted] ) en [redacted] varken met [redacted] ( [redacted] ) Dit zijn dus [redacted] extra dieren. Het totaal komt dan op [redacted] dieren. [redacted] Dieren vragen we extra aan in het geval er perioperatieve complicaties zijn die niets van doen hebben met de sealant. We denken dan vooral aan luchtembolie of extubatieproblemen met laryngospasmen (naar aanleiding van onze eerdere ervaring met varkens in buikligging opereren). We vragen dus [redacted] dieren aan, maar hopen [redacted] dieren te opereren.

[redacted]

[redacted]

[redacted]





> 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  
AVD115002016457  
**Bijlagen**  
1

Datum 26-4-2016  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 9 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Feasability study new dural sealant" met aanvraagnummer AVD115002016457. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u het aantal benodigde dieren verhelderd. Dit is ons nu duidelijk.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De voorwaarde betreffende afstemming van het go / no go moment met de IvD wordt gesteld om onnodig inzet van dieren in proeven te voorkomen. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Feasability study new dural sealant" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 april 2016 tot en met 1 juni 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 2 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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

#### **Bezwaar**

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

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

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

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


Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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

## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 april 2016 tot en met 1 juni 2018, voor het project "Feasability study new dural sealant" met aanvraagnummer AVD115002016457, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht . De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is

■■■■■■■■■■ Voor de uitvoering van het project is ■■■■■■■■■■ verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 maart 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 maart 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 2 maart 2016, ontvangen op 9 maart 2016.
  - d Uw aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 april 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Dura lekkage testen in varkens	Varkens (Sus scrofa domesticus) / Dutch Landrace	45	Matig	

### Voorwaarden

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

-De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de go/no go momenten na de eerste drie varkens en eventueel na complicaties naderhand, worden afgestemd met de IvD.

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

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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

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



**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 29 april 2016 11:41  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD115002016457

Geachte DEC Utrecht ,

Op 07-03-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Feasability study new dural sealant' met aanvraagnummer AVD115002016457.

De CCD heeft de aanvrager gevraagd het aantal benodigde dieren te verduidelijken.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de go/no go momenten na de eerste drie varkens en eventueel na complicaties naderhand, worden afgestemd met de IvD.

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

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)