

erg klein is.

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. Door het toedienen van premedicatie voorafgaand aan de narcose wordt stress zoveel mogelijk weggenomen. Alle handelingen vinden plaats tijdens de narcose, waarna het dier wordt gedood zonder dat het nog ontwaakt uit de narcose. Verdere verfijning is niet mogelijk. De DEC is er dan ook van overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. *In de toegevoegde experimenten komen de dieren weer bij uit de narcose, en worden zij nog 7 dagen gevolgd. Bij replantatie van vrije spierlappen veroorzaakt dit matig ongerief, bij replantatie van de voorpoot in niet-anatomische positie zelfs ernstig ongerief. Om aan te tonen dat de gereplanteerde weefsels gedurende langere tijd vitaal blijven zijn de voorgestelde experimenten met de vrije spierlappen noodzakelijk. Om aan te tonen dat de functionaliteit behouden blijft en er geen compartimentsyndroom ontstaat in een gereplanteerde extremiteit, zijn de voorgestelde experimenten met de voorpoot noodzakelijk. Het varken zal na de replantatie geen gevoel hebben in de weer aangezette poot. De onderzoekers doen er alles aan om te zorgen dat de gereplanteerde poot niet zal beschadigen door schuurgedrag of door kooigenoten. Het nemen van biopten of het testen van het effect van zenuwstimulatie zal onder anesthesie plaatsvinden, zodat het dier hier zo min mogelijk last van heeft. De commissie is er van overtuigd dat de in de wijziging beschreven dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.* De wijzigingen in het operatieprotocol en de nazorg leiden tot betere belastbaarheid van de achterpoot en intensievere post-operatieve begeleiding. Hierdoor worden de proeven verder verfijnd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.* De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd. *De voorgestelde wijziging is verwerkt in de nieuwe NTS.*

D. Ethische afweging

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

Met dit onderzoek worden belangrijke inzichten verworven in het gebruik van de mini-hart-longmachine voor het buiten het lichaam bewaren van spierlappen of ledematen, waarna deze met behoud van vitaliteit getransplanteerd kunnen worden. Op termijn kunnen deze resultaten bijdragen aan de ontwikkeling van meer succesvolle weefseltransplantaties. Het belang van deze ontwikkeling acht de DEC substantieel, omdat hiermee een aantal complicaties tijdens grote operaties kan worden ondervangen. *De tot nu toe behaalde resultaten geven geen uitsluitel over de vitaliteit en de functie van gereplanteerd weefsel op de langere termijn. Deze informatie is noodzakelijk voor een goede inschatting van de maximale bewaartijd van geamputeerde ledematen of andere weefsels met behulp van de mini-hart-longmachine. Een langere bewaartijd draagt bij aan kortere wachttijden voor patiënten die een orgaan of (deel van een) extremiteit nodig hebben, en is belangrijk bij traumachirurgie wanneer een patiënt nog niet geopereerd kan worden. De resultaten die worden behaald met de middels de wijziging voorgestelde experimenten zijn van groot belang voor de transplantatiegeneeskunde, inclusief replantaties binnen de traumachirurgie en transplantaties van organen en extremiteiten.* Door onvoorziene omstandigheden zijn drie experimenten waarin spierlappen zijn gereplanteerd vroegtijdig beëindigd, waardoor geen goede indruk is verkregen van de

vitaliteit van dit weefsel op de langere termijn. Om wetenschappelijk betrouwbare uitspraken te kunnen doen zijn meer dieren noodzakelijk. Middels dit wijzigingsverzoek worden twee extra varkens aangevraagd. De commissie is van mening dat het operatieprotocol en het protocol voor post-operatieve nazorg op een goede manier zijn aangepast, waardoor uitval van meer dieren zoveel mogelijk kan worden voorkomen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat ~~alle~~ 80 dieren licht ongerief zullen ondervinden als gevolg van de narcose waaruit zij niet meer zullen ontwaken. *Voor ~~12~~ 14 dieren zal het ongerief matig zijn omdat zij na replantatie van vrije spierlappen weer bijkomen uit de narcose en nog 7 dagen gevolgd zullen worden. Voor maximaal 24 dieren zal het ongerief ernstig zijn, omdat hun voorpoot wordt geamputeerd en na 18 tot 24 uur wordt teruggeplaatst in niet-anatomische positie waardoor zij op 3 poten moeten staan.* 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 experimenten die ernstig ongerief voor de dieren veroorzaken leveren belangrijke informatie op over spierfunctionaliteit na replantatie die niet behaald kan worden met experimenten die minder ongerief veroorzaken (zie punt C3), en zullen pas uitgevoerd worden wanneer de daaraan voorafgaande experimenten met vrije spierlappen zeer veelbelovend zijn. De aanvrager biedt aan de DEC te betrekken bij de beslissing om het onderzoek voort te zetten. De DEC is echter van mening dat dit de taak van de IvD is (zie punt C8).* De onderzoeker heeft de protocollen op adequate wijze aangepast, hetgeen in de praktijk leidt tot verdere verfijning van de experimenten waarbij vrije spierlappen worden gereplanteerd en de dieren na de operatie nog 7 dagen gevolgd worden.

De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst 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 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
T.a.v. Dr. M. Kool
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016627-3
Bijlagen
3

Datum 21 september 2020
Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte Dr. Kool,

Op 9 juli 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het toepassen van een mini hart-longmachine op de transplantatie van spierweefsel en ledematen" met aanvraagnummer AVD103002016627-3. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 31 augustus 2016 tot en met 18 augustus 2021.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Datum:

21 september 2020

Aanvraagnummer:

AVD103002016627-3

Advies dierexperimentencommissie.

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie RU DEC (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 7 september 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 9 september 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het ongerief in de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk augustus 2022 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

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 93118, 2509 AC 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Datum:
21 september 2020
Aanvraagnummer:
AVD103002016627-3

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- 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 wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 31 augustus 2016 tot en met 18 augustus 2021, voor het project "Het toepassen van een mini hart-longmachine op de transplantatie van spierweefsel en ledematen" met aanvraagnummer AVD103002016627-3, na advies van dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is arts.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 9 juli 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 1 april 2020;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 11 september 2020;
 - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 7 september 2020
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 11 september 2020.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ongerief |
|--|---------------------------------|------------------|----------------|
| 3.4.4.1 Pilot perfusie spierlap | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) | 5 | 100,0% Licht |
| 3.4.4.2 Perfusie en replantatie spierlap | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) | 18 | 100,0% Licht |
| 3.4.4.3 Perfusie en replantatie poot | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) | 39 | 100,0% Licht |
| 3.4.4.4 Pilot trombolysse | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) | 5 | 100,0% Licht |
| 3.4.4.5 Trombolysse en replantatie spierlap | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) | 16 | 100,0% Licht |
| 3.4.4.6 Replantatie abdominale spierlap + 1 week observatie | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) | 12 14 | 100,0% Matig |
| 3.4.4.7 Replantatie ledemaat + 1 week observatie | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) | 24 | 100,0% Ernstig |

Aanvraagnummer:
AVD103002016627-3

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk augustus 2022 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:
AVD103002016627-3

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

Pijnbestrijding en verdooving

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

Aanvraagnummer:

AVD103002016627-3

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 van de wet 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 van de wet 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 van de wet 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, eerste lid onder d en derde lid 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.

DEC-advies AVD103002016806-5

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD103002016806-5 / 2016-0039
2. Titel van het project: Maternal serotonergic genotype matters! Placental processes and serotonin's trophic neurodevelopmental effects
3. Titel van de NTS: Nieuwe inzichten in de rol van serotonine in psychische ontwikkelingsstoornissen; een belangrijke rol voor serotonine van de moeder
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer AVD103002016806
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
 -
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 09-05-2019
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 14-05-2019
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en)
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD: 27-05-2019
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager: n.v.t.
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging op een vergunning. Aanvullend advies van de DEC over de wijziging is, gemarkeerd met *italics*, ingevoegd in de tekst van het oorspronkelijke advies hieronder.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. *De experimenten in dit projectvoorstel worden voorafgegaan door een pilot waarin het effect van het uitschakelen van het TPH1 gen op het gedrag van de dieren wordt onderzocht. Een onverwacht resultaat hierbij is dat de dieren waarschijnlijk minder angstig gedrag vertonen, maar door de opzet van het experiment kan dit niet met zekerheid geconcludeerd worden. Aangezien het design van de vervolgexperimenten afhankelijk is van de resultaten van de pilot, willen de onderzoekers opnieuw het angstige gedrag van de TPH1-/- dieren (en relevante controledieren) op volwassen leeftijd testen. Zij gebruiken hiervoor twee reeds in de vergunning beschreven gedragstesten, waarvan één in geringe mate is gewijzigd, zodat duidelijker wordt of het angstniveau van de KO-dieren op volwassen leeftijd inderdaad verschilt van de controledieren.*
2. Voor zover de DEC weet is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is onderzoeken op welke manier maternaal serotonine tijdens de dracht van invloed is op het ontstaan van neuro-ontwikkelingsstoornissen bij de nakomelingen. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe interventies tijdens de vroege zwangerschap om neuro-ontwikkelingsstoornissen te voorkomen of te verminderen. De onderzoekers zullen uitvoerig onderzoeken op welke manier maternaal serotonine de hersenontwikkeling van embryo's kan beïnvloeden. Het is aannemelijk dat dit in mensen op vergelijkbare wijze gebeurt. De DEC is van mening dat er binnen dit project een reële relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. Voorts is de DEC van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmogelijkheden. Carrière mogelijkheden en welstand kunnen door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en

wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis). Er dient tenminste (ook) sprake te zijn van een algemeen of publiek belang, wil een dierproef gerechtvaardigd zijn.

Voor patiënten is dit onderzoek indirect van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun geestelijke gezondheid en kwaliteit van leven. Gerichtte preventie op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan het voorkomen of verminderen van neuro-ontwikkelingsstoornissen. Dit kan er toe leiden dat kinderen zich normaal kunnen ontwikkelen, dan wel een betere kwaliteit van leven hebben. Het voorkomen of verminderen van neuro-ontwikkelingsstoornissen zoals ADHD en autisme, is van groot belang voor de samenleving. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

6. De onderzoekers maken gebruik van transgene dieren waarbij zij de nationale GGO-regels in acht nemen. Hierdoor is er geen sprake van belangwekkende milieueffecten. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Proefopzet en haalbaarheid

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

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

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

De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de gedragstesten. Voor 70% van de dieren zal het ongerief licht zijn, voor de overige dieren matig. *Het ongerief voor de middels deze wijziging extra*

aangevraagde dieren is licht, aangezien zij twee gedragstesten ondergaan die licht ongerief veroorzaken.

12. De integriteit van dieren is aangetast doordat zij genetisch gemodificeerd zijn. Als gevolg hiervan is hun serotonine-huishouding verstoord, hetgeen kan leiden tot licht afwijkend gedrag ten opzichte van wildtype dieren. Bij één van de gebruikte diermodellen kunnen op latere leeftijd mogelijk hartproblemen optreden waardoor zij minder goed kunnen functioneren. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van eerdere ervaring met deze diermodellen en de beschreven handelingen ingeschat. Men verwacht dat TpH1 KO ratten een vergelijkbaar fenotype zullen hebben als TpH1 KO muizen. Het gehanteerde humane eindpunt is hierop gebaseerd. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Neuro-ontwikkelingsstoornissen kunnen niet goed bestudeerd worden met proefdiervrije alternatieven. Het gedragsrepertoire van een rat is uitgebreid genoeg om deze ontwikkelingsstoornissen te kunnen onderzoeken. Om ethische redenen is het niet mogelijk dit onderzoek bij mensen uit te voeren. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolggewijze experimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De commissie heeft met de aanvragers gediscussieerd over het inbouwen van een belangrijk go / no go moment aan het begin van dit onderzoek, en de noodzaak om dit onderzoek zowel in mannelijke als in vrouwelijke dieren apart uit te voeren. De commissie is er van overtuigd dat de onderzoekers hierin goede keuzes zullen maken waardoor er niet onnodig dieren worden gebruikt. *Om wetenschappelijk betrouwbare uitspraken te kunnen doen over het angstig gedrag van TpH1 KO dieren is het noodzakelijk om het experiment te herhalen, waarbij alleen de gedragstesten worden uitgevoerd die angstig gedrag op volwassen leeftijd meten.*
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Er is zoveel mogelijk gekozen voor gedragstesten die licht ongerief voor de dieren veroorzaken. Enkele gedragstesten veroorzaken matig ongerief, maar zijn noodzakelijk om belangrijke gedragskenmerken te kunnen meten. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De vraagstelling wordt in mannelijke en vrouwelijke dieren apart onderzocht. Wanneer uit eerdere experimenten blijkt dat een effect slechts in één van beide sexen optreedt, dan worden vervolggexperimenten alleen met die sexe uitgevoerd. De pilotexperimenten worden alleen met mannelijke dieren gedaan omdat hiermee het optreden van de neurotrofe hypothese in deze diermodellen bevestigd kan worden en dit effect bij mannelijke dieren het grootst zal zijn. Op deze manier zullen minder dieren nodig zijn dan wanneer zowel mannelijke als vrouwelijke dieren hiervoor gebruikt worden. De DEC is van mening dat de aanvrager deze aanpak in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed*
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken. Voor de doelgroep/patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun geestelijke gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Neuro-ontwikkelingsstoornissen zoals ADHD en autisme zijn chronische aandoeningen die een grote impact hebben op patiënten en hun naasten tijdens alle levensstadia. De bestaande behandelingen zijn niet altijd effectief genoeg of hebben vervelende bijwerkingen. De resultaten van dit project zullen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe interventies om ontwikkelingsstoornissen te voorkomen of te verminderen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het voorkomen of verminderen van neuro-ontwikkelingsstoornissen van substantieel belang. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: onderzoeken op welke manier maternaal serotonine van invloed is op het ontstaan van neuro-ontwikkelingsstoornissen bij ratmodellen, om uiteindelijk nieuwe interventies tijdens de vroege zwangerschap bij mensen te kunnen uitvoeren om neuro-ontwikkelingsstoornissen te voorkomen of te verminderen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en

integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan. *Er worden middels dit wijzigingsverzoek 36 extra dieren gevraagd voor een extra pilot experiment. De Tph1 KO dieren lijken op basis van de eerste pilot (onverwacht) minder angstig dan controledieren. De middels deze wijziging gevraagde extra dieren zijn noodzakelijk om een wetenschappelijk betrouwbare uitspraak te kunnen doen over het angstniveau van deze dieren. Deze informatie is nodig voor het design van de experimenten met Tph1 KO dieren die in de verleende vergunning (AVD103002016806) zijn beschreven.*

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in | 10300

Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Heeft u al een AVD nummer?

Ja > Vul uw AVD nummer in | 103002016806-5

Nee

1.3 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag

Komt de aanvraag in aanmerking voor de vereenvoudigde procedure?

Ja > Ga verder met vraag 1.4

Nee > Ga verder met vraag 1.4

Wijziging of melding > Ga verder met vraag 2.1

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

| | | | | |
|---|--|-------------------|---------------------------|--|
| Naam instelling of organisatie | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | | | |
| Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder | Titel Prof. dr. | Voorletters H. | Achternaam Van Krieken | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw |
| E-mailadres contactpersoon | | | | |
| Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing) | Titel | Voorletters | Achternaam | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw |
| E-mailadres gemachtigde | instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl | | | |

Vul de gegevens van het postadres in.

| | | | |
|-----------------------------|------------------|----------|----------------|
| Straat en huisnummer | Geert Groteplein | | 29 / HP 231 |
| Postcode en plaats | 6525 EZ | Nijmegen | |
| Postbus, postcode en plaats | 9101 | 6500 HB | Nijmegen |

1.5 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

| | | | | |
|-----------------------------|---------------|--|--|---|
| (Titel) Naam en voorletters | 10.2 .e. en g | | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | | | | |
| Afdeling | | | | |
| Telefoonnummer | | | | |

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- | | |
|-----------------------------|---|
| E-mailadres | 10.2 .e. en g@radboudumc.nl |
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | PhD student |
| Afdeling | 10.2 .e. en g |
| Telefoonnummer | 10.2 .e. en g |
| E-mailadres | radboudumc.nl |
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
- 1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.
- | | |
|-----------------------------|--|
| E-mailadres | |
| (Titel) Naam en voorletters | |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 1.8 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn
- | | |
|----------------|--|
| Telefoonnummer | 10.2 .e. en g |
| E-mailadres | instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl |
- 1.9 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 Gaat uw aanvraag over een *wijziging* op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?
- Nee > Ga verder met vraag 2.2
- Ja > Geef hier onder weer wat deze wijziging inhoudt en onderbouw deze. Antwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- De gedragstaak – in het experiment uit DAP1 -waar we een onverwachts mogelijk statistisch verschil (trend) in genotype hebben gevonden zal opnieuw worden uitgevoerd met nieuwe dieren. Het is namelijk cruciaal om het fenotype te bevestigingen voordat we vervolg experimenten – in DAP2 en DAP3 -kunnen inplannen. Vandaar:
- Aanvraag voor meer dieren: 12 TPH1 WT; 12 TPH1 HET; 12 TPH1 KO voor uitbreiding van DAP1.
 - Aanpassing aan de tijdlijn, niet alle gedragstesten hoeven (opnieuw) uitgevoerd te worden. Trends in verschillen tussen de genotypen zijn gevonden op volwassen leeftijd in angstig gedrag. Om deze reden zullen we ons alleen focussen op taken welke gericht zijn op het testen van angstig gedrag.
- De dieren zullen ook ditmaal op maximaal 4 maanden geofferd worden en een ongewijzigd ongerief hebben; licht (02).
- 2.2 Gaat uw aanvraag over een *melding* op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|-----------------|----------------|
| Startdatum | 22 - 02 - 2017 |
| Einddatum (t/m) | 28 - 01 - 2022 |

| | | | |
|-----|---|---|---|
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | Maternal serotonergic genotype matters! Placental processes and serotonin's trophic neurodevelopmental effects | |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | Nieuwe inzichten in de rol van serotonine in psychische ontwikkelingsstoornissen; een belangrijke rol voor serotonine van de moeder | |
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur? | Naam DEC | RU DEC |
| | | Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen (HP 231) |
| | | E-mailadres | dierexperimentencommissie@radboudumc.nl |

4 Factuurgegevens

| | | | | |
|-----|--|--|------------------------|------------------------|
| 4.1 | (optioneel) Vul de gegevens van het factuuradres in. | Naam: 10.2 .e. en g | Afdeling: 10.2 e. en g | |
| | | Straat: Geert Groteplein | | Huisnummer: 29 / HP231 |
| | | Postcode: 6525 EZ | Plaats: Nijmegen | |
| | | Postbus: 9101 | Postcode: 6500 HB | Plaats: Nijmegen |
| | | E-mail: instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl | | |
| 4.2 | (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in. | Ordernummer: Kostenplaats: 040823-461220; CDL projectnummer: 2016-0039 | | |

5 Checklist bijlagen

| | | |
|-----|------------------------------|---|
| 5.1 | Welke bijlagen stuurt u mee? | Verplicht |
| | | <input type="checkbox"/> Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1 |
| | | <input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting |
| | | Overige bijlagen, indien van toepassing |
| | | <input type="checkbox"/> Melding Machtiging |
| | | <input type="checkbox"/> |

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.9). 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 | 10.2 .e. en g |
| Functie | IvD |
| Plaats | Nijmegen |
| Datum | |
| Handtekening | |



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
t.a.v. 10.2.e. en g
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD10300206806-5

Bijlagen
1

Datum 26 juli 2019
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer 10.2.e. en g

Op 8 mei 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Maternal serotonergic genotype matters! Placental processes and serotonin's trophic neurodevelopmental effects" met aanvraagnummer AVD103002016806, waarvoor op 20 februari 2017 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD103002016806-5. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u dieren toe te voegen aan Bijlage Dierproeven 3.4.4.1. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Maternal serotonergic genotype matters! Placental processes and serotonin's trophic neurodevelopmental effects" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie RUDEC (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 27 mei 2019. 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 DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Overwegingen

Op grond van de bovenstaande stukken zijn wij van mening dat de toe te voegen dierproeven toelaatbare wijzigingen betreffen van het project, waarvoor op 20 februari 2017 een vergunning is verleend.

Datum
26 juli 2019

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD10300206806-5

Vergunning

Uw vergunning wijzigt als volgt (wijzigingen cursief gedrukt):

| Naam dierproef | Diersoort | Aantal dieren | Ernst |
|---------------------|-----------|----------------|------------|
| 3.4.4.1 Pilot study | Ratten | <i>164 200</i> | 100% licht |

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.
U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

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 93118, 2509 AC, Den Haag.

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

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

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

Drs. F. Braunstahl

Bijlagen
- DEC-advies



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

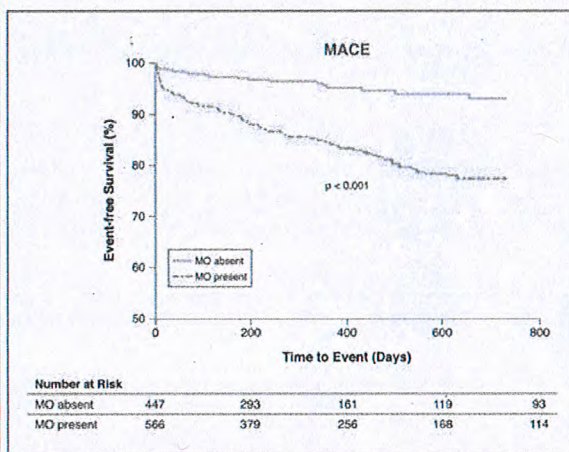
3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).

- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Vandaag de dag zijn hart- en vaatziekten nog steeds doodsoorzaak nummer 1 wereldwijd en naar verwachting zal het aantal patiënten met kransslaglijden in de toekomst nog verder toenemen. De meest heftige manifestatie hiervan is het acuut myocardinfarct, waarvoor revascularisatie middels primaire percutane coronaire interventie (PCI; dotterbehandeling) de gouden standaard is. De PCI heeft de mortaliteit van een hartinfarct teruggebracht naar minder dan 5%. Echter, in 40-50% van de patiënten welke voor een acuut myocardinfarct worden behandeld middels PCI blijft –ondanks succesvolle revascularisatie– een deel van het vaatbed suboptimaal geperfundeed. Dit betreft voornamelijk de capillairen en wordt *No-Reflow* genoemd. No-reflow kan het beste zichtbaar worden gemaakt met MRI en is gerelateerd met een verminderde myocardiële perfusie. Daarnaast gaat de aanwezigheid van no-reflow gepaard met een verhoogde morbiditeit en mortaliteit (figuur 1).



Figuur 1. Aanwezigheid van no-reflow, hier microvasculaire obstructie (MO) genoemd, gaat gepaard met significante toename in Major Adverse Cardiac Events (MACE), ten opzichte van de afwezigheid van MO.

Bron: Van Kränenburg et al, JACCci, 2014

hemorragie of IMH genoemd. Het optreden van IMH staat in contrast met de eerdere hypothese dat bloedpropjes verantwoordelijk zijn voor het no-reflow fenomeen en zet vraagtekens bij het huidige gebruik van bloedverdunders rondom een dotterprocedure.

Om te bestuderen wanneer de capillairen precies beschadigd raken, hebben we onlangs een coronair ischemie-reperfusie experiment in ratten uitgevoerd, waarbij we hebben aangetoond dat bij voorbijgaande ischemie de coronaire microcirculatie voornamelijk gedurende reperfusie beschadigd raakt en in mindere mate gedurende ischemie (). Dit betekent dat er na het openen van het afgesloten bloedvat, therapeutische ruimte bestaat om schade aan de microvasculatuur te beperken. In dit en het huidige onderzoek is gekozen voor een ratmodel, omdat hier in de cardiovasculaire wetenschap geruime ervaring mee is, ratten voldoende groot zijn om een van de coronairen chirurgisch af te binden en relatief lage kosten met zich mee brengen. Daarnaast komt de anatomie van het hart in grote mate overeen met dat van de mens. Zodoende zijn de resultaten goed vertaalbaar naar de humane situatie.

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?

Onderzoeksdoel:

Dit onderzoeksproject richt zich op het optreden van IMH en heeft als hoofddoel te onderzoeken welke mechanismen verantwoordelijk zijn voor endotheelschade en in hoeverre enkele veel voorgeschreven medicijnen (o.a. bloedverdunners) van invloed zijn op het optreden van IMH. Om dit te onderzoeken zijn een aantal onderzoeksvragen/subdoelen opgesteld.

- 1) Wat is het effect van endotheelmodulerende middelen op het optreden van vaatlekkage en intramyocardiale hemorrhagie in een cardiaal ischemie-reperfusiemodel.
- 2) Wat is het effect van externe factoren (medicatie) op het optreden van vaatlekkage en intramyocardiale hemorrhagie in een cardiaal ischemie-reperfusie model.

Haalbaarheid:

De haalbaarheid van dit project is groot, doordat er in onze onderzoeksgroep veel ervaring is opgebouwd met dit model. Daarnaast zal bij de uitvoering van de experimenten en de hier opvolgende analyses nauw worden samengewerkt met de afdelingen Cardiologie, Pathologie, Fysiologie, en Celbiologie, Radiologie en Nucleaire geneeskunde. Hierdoor kunnen verschillende expertises worden gecombineerd voor een optimaal resultaat. Het gebruikte hartinfarctmodel met ratten is veel beschreven in de literatuur voor onderzoek naar hart- en vaatziekten, waardoor resultaten goed vergelijkbaar zijn. Vanuit een praktisch oogpunt wordt de haalbaarheid vergroot doordat alle benodigde apparatuur aanwezig en biedt het lokale universitair proefdiercentrum alle benodigde faciliteiten voor een succesvolle uitvoering. Tot slot, voor dit onderzoeksproject hebben 102 e. en g

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang

Voordat er een adequate behandeling tegen IMH ontwikkeld kan worden, is het van groot belang dat eerst de basismechanismen wordt doorgrond, welke verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van IMH. Hiervoor is gedegen kennis nodig van de verschillende processen die spelen in het hart rondom een dotterbehandeling.

Maatschappelijk belang

Nederland telt 1 miljoen hart- en vaat patiënten en jaarlijks krijgen er 30.000 mensen een hartinfarct in ons land. Dat zijn ongeveer 80 mensen per dag. Het merendeel van deze patiënten zal een dotterbehandeling ondergaan, en daarbij mogelijk IMH ontwikkelen. Indien IMH voorkomen of genezen kan worden, is dit van groot maatschappelijk belang.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Diermodel

Om de ontstaanswijze van IMH te onderzoeken zullen wij gebruik maken van een ischemie-reperfusiemodel. De humane situatie, waarbij IMH enkel wordt gezien na een myocardiinfarct (ischemie), met aansluitende een succesvolle revascularisatie (reperfusie) wordt goed nagebootst door dit diermodel. Uit eerdere experimenten is gebleken dat dit model in forse mate IMH induceert, ook in gezonde rattenharten waarbij <60 min ischemie is geïnduceerd (Hollander et al., PLOS ONE, 2016). Middels non-invasieve (cardiale) beeldvorming, zoals Cardiac Magnetic Resonance Imaging (CMR), kunnen we onder andere non-invasief de mate van IMH en verschillende imaging tracers na een acuut myocardi infarct bestuderen, waarmee de vertaalslag naar patiënten in de kliniek vergroot wordt. Daarnaast zullen wij aan het eind van het experiment de rattenharten ex-vivo perfunderen en laten functioneren in een Langendorff opstelling. Dit stelt ons in staat om in een controleerde omgeving vaatlekkage en hartfunctie te kwantificeren. ~~Eveneens wordt~~

de Langendorff techniek gebruikt om directe harteffecten van de interventies te bestuderen op onder andere weefselschade en infarct grootte. De Langendorff is een relatief snelle techniek om weefsel schade op een translationele manier te bepalen en wordt door het I/R onderzoeksveld veelvuldig gebruikt.

Binnen deze studie dienen wij te onderzoeken in hoe verre micro-vasculaire dysfunctie leidt tot de verergering van ischemie-reperfusie schade. Het is hiervoor noodzakelijk om het effect van de (medicamenteuze) therapieën op infarct grootte en uitscheiding schademarkers te meten. We dienen namelijk te weten of micro-vasculaire schade en de verlaging ervan door de voorgestelde therapieën daadwerkelijk gecorreleerd zijn met infarct grootte en uitscheiding schademarkers; de meest geaccepteerde voorspellers van prognose na myocardiaal infarct. Om het mechanisme en ontstaanswijze van bloedingen in het hart na een hartinfarct te kunnen begrijpen, dienen we de hart- en niet-hart-componenten van elkaar te scheiden. Het gebruik van een ex vivo myocardiaal infarct model zorgt dat we directe hart effecten kunnen bestuderen en zodoende mechanismes kunnen herleiden naar het hart of juist naar systemische/circulatoire elementen. Dit geeft ons naast inzicht in de causaliteit van processen die leiden tot ischemie-reperfusie schade ook meer kennis over de werking van de te toetsen (medicamenteuze) therapieën (direct/non-direct effect op het hart).

Ischemie- en reperfusieduur

In de humane situatie is een ischemieduur van ≤ 60 minuten relatief kort, waarbij de meeste myocardiale schade in de eerste 2-3 uur van ischemie wordt veroorzaakt (Gerschlick, LANCET, 2013). In ratten is de duur waarbij maximale myocardiale schade optreedt echter korter; de meeste schade treedt al op in de eerste 60 minuten van ischemie, waarna een plateaufase wordt bereikt (Manintveld, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009). In dit model passen wij daarom een maximale ischemieduur toe van 60 minuten. Uit eerdere experimenten uit onze groep en uit de literatuur blijkt dat de meeste reperfusieschade plaatsvindt vanaf 60 minuten na het ophieffen van ischemie. Dit houden we ook aan in het huidige voorstel.

Diergroepen

In dit project bestuderen we twee categorieën middelen, welke allebei mogelijk van invloed zijn op het optreden van vaatlekkage en intramyocardiale hemorragie. Deze twee categorieën kunnen elk worden onderverdeeld in meerdere groepen middelen. Elke groep grijpt (binnen de desbetreffende categorie) op een andere manier aan op vaatpermeabiliteit en/of IMH. Door deze groepen met elkaar te vergelijken, wordt inzicht verkregen in de ontstaanswijze van vaatlekkage en IMH. Daarnaast is het binnen een aantal van deze groepen mogelijk meerdere soorten middelen te onderscheiden, welke elk net op een andere wijze werken. We zullen dus ook binnen de groepen kijken naar welke soort middel het meest gunstig effect heeft. Dit geeft niet alleen extra informatie over de pathofysiologie, maar helpt ook een keuze te maken in eventuele vervolgstudies.

Hieronder staat de twee categorieën, met de hieronder vallende groepen en soorten middelen beschreven. Daarbij is per groep aangegeven hoeveel soorten middelen er maximaal onderzoeken zullen worden. Een schematisch overzicht is tevens in figuur 2 in de Bijlage Figuren weergegeven.

In de eerste categorie richten we ons op de microcirculatie, omdat deze het meest kwetsbaar is en als eerste is aangedaan bij een myocardinfarct. De microcirculatie bestaat vrijwel volledig uit een enkele laag endotheelcellen, welke de barrière vormt tussen de bloedbaan en de hartspier. Wanneer het endotheel beschadigd raakt, zal de barrière functie afnemen, waardoor er IMH kan optreden. Om te onderzoeken welke interne factoren precies bijdragen aan het optreden van IMH, zullen we in een reeks experimenten ingrijpen op verschillende factoren waarvan bekend is dat zij een rol spelen bij endotheel functie en/of vaatpermeabiliteit. De middelen die wij hiervoor zullen gebruiken zijn onderverdeeld in groepen, welke hieronder staan opgenoemd. Gezien het feit dat onze focus primair ligt op de interne factoren die IMH veroorzaken, zijn in deze categorie meer groepen opgenomen dan in de tweede categorie.

1. *Proteïnekinaseremmers*. Proteïnekinaseremmers zijn er in vele vormen en kennen een tal van indicaties, waaronder de behandeling van kanker. Van een aantal van deze middelen is bekend dat

zij ook vaatpermeabiliteit kunnen beïnvloeden. Wij zullen drie middelen testen waarvan beschreven is dat zij (elders in het lichaam) vaatlekkage kunnen remmen.

2. *C1-esteraseremmer*, lichaamseigen eiwitten welke het complementsysteem remt en waarvan is aangetoond dat het beschermt tegen vaatlekkage en endotheelschade. Daarnaast beïnvloedt C1-esteraseremmer de stollingscascade.
3. *Statines*. Deze cholesterolsyntheseremmers verlagen niet alleen de plasmaspiegels van cholesterol, maar hebben ook een beschermend effect op het endotheel, o.a. door de preventie van oxidatieve stress en relatieve hyperglykemie (reperfusie). Globaal worden voornamelijk 3 soorten statines voorgeschreven, welke wij zullen testen.
4. *Aquaporines*, een groep lichaamseigen eiwitten welke zich in het membraan van endotheelcellen bevindt en van belang is bij de regeneratie van endotheelcellen. Aquaporines worden verminderd tot expressie wordt gebracht in ziek, atherosclerotisch endotheel. Van een aantal middelen welke ingrijpen op met name Aquaporine-1 en 4 is bekend dat zij vaatpermeabiliteit beïnvloeden. Wij zullen maximaal 3 van deze middelen onderzoeken.
5. *Angiopoïëtine-like proteïnes*. Deze uitscheidbare eiwitten spelen een rol bij de cholesterolhuishouding. Van deze middelen is in het brein aangetoond dat ze vaatlekkage en oedeem kunnen beschermen (na een periode van ischemie). Er zullen maximaal 3 angiopoïëtine-like proteïnes worden getest.
6. *CD40-signalering*. CD40 is een molecuul wat zich onder andere op endotheelcellen bevindt. en speelt een rol bij vaatpermeabiliteit. Het is reeds aangetoond in het brein dat remming van CD40-ligand (wat aan CD40 bindt en stimuleert) ischemie-reperfusieschade remt. Er zijn meerdere manieren om de CD40 signalering te remmen. Wij zullen hiervan maximaal 2 stoffen testen.
7. *Glucose-gehalte*. Het is bekend dat diabetici een toegenomen vaatpermeabiliteit hebben en dat hoge glucosespiegels de integriteit van endotheelcellen kunnen verminderen. In hoeverre dit een rol speelt rondom een hartinfarct is niet bekend. Er zullen maximaal 4 verschillende glucosegehalten worden getest.

De tweede categorie die we zullen onderzoeken behelst de antistollingsmiddelen. Naar mate vaatlekkage groter wordt, zullen rode bloedcellen buiten bloedbaan treden (IMH). Normaliter weerhoudt het stollingssysteem een massale uitreding van rode bloedcellen. Dit stollingssysteem wordt echter in de meeste hart- en vaatpatiënten medicamenteus geremd. Er zijn dus mogelijk ook externe factoren die het optreden van IMH beïnvloeden. Wij zullen de invloed van deze middelen op het optreden van IMH onderzoeken. Hierin is een onderscheid te maken tussen drie groepen antistollingsmiddelen, welke elk op een andere wijze ingrijpen op de stolling. De groepen die we zullen onderzoeken zijn:

1. *Trombineremmers*. Deze stoffen blokkeren trombine. Trombine activeert de bloedplaatjes (= trombocyten) waardoor het stollingsproces in gang wordt gezet. Maximaal 4 verschillende trombineremmers zullen worden getest.
2. *Trombocytenaggregatieremmers*. Deze stoffen remmen de trombocytenaggregatie en op deze manier de vorming en groei van stolsels. Maximaal 4 verschillende trombocyten-aggregatieremmers zullen worden getest.
3. *Factor Xa-remmers*. Deze middelen remmen de activiteit van stollingsfactor Xa. Factor Xa leidt tot de vorming van trombine. Maximaal 4 verschillende Factor Xa-remmers zullen worden getest.

In beide categorieën zullen ook placebogroepen worden meegenomen. Per categorie zal voor elke groep middelen een placebogroep gebruikt worden (maximaal 10). Als primaire uitkomstparameters hanteren wij de mate van vasculaire permeabiliteit, welke wordt vastgesteld middels enkele vaatlekkagetracers en de mate van intramyocardiale hemorragie. Daarnaast zullen we de veranderingen in de morfologie van endotheelcellen bestuderen.

In alle groepen van het project zal gebruik worden gemaakt van het zelfde type dierproef, welke hieronder en in de bijlage Bijschrijving dierproeven (volgnummer 1, 2 en 3) is beschreven.

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

In experimenten zal gebruik gemaakt worden van twee cardiaal ischemie-reperfusiemodellen met ratten; een ex vivo en een in vivo ischemie reperfusie model.

1. In vivo model: Hierbij wordt één van de kransslagaders tijdelijk volledig afgebonden, en daarna weer geopend om de humane situatie na te bootsen, waarin patiënten met een acuut hartinfarct worden gedotterd. Dit dient in-vivo te gebeuren, omdat de complexe samenhang tussen anatomie, hemodynamica en celmetabolisme niet goed buiten het lichaam is na te bootsen. Er wordt met ratten gewerkt, omdat ratten een cardiale anatomie hebben, die zeer vergelijkbaar is met de mens. Dit is een erkend model om hart- en vaatziekten te bestuderen en wordt veel in de literatuur gebruikt. Tot slot, wij hebben ruime ervaring met dit model.
2. Ex vivo model: Tijdens de Langendorff experimenten kunnen we in een gecontroleerde omgeving de effecten van een therapie onderzoeken op een vrij snelle manier, waarbij specifieke vraagstukken beantwoord kunnen worden die de in vivo experimenten kunnen optimaliseren. De Langendorff techniek is overigens al onderdeel van dit project.

Een overzicht van de hoofdlijnen is ook schematisch weergegeven in de Bijlage Figuren (Figuur 1).

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Het no-reflow fenomeen wordt gekenmerkt door schade aan de capillairen, waarbij vaatlekkage optreedt en rode bloedcellen buiten de bloedbaan treden. In dit project kijken we in eerste instantie naar enkele interne factoren die van invloed zijn op het optreden van vaatlekkage. Tevens kijken we naar de rol van externe factoren (antistollingsmiddelen) op het optreden van IMH. Er is geen bepaalde volgorde in de uitvoering van de experimenten.

Voor een schematisch overzicht van de verschillende onderdelen zie de Bijlage Figuren (Figuur 2). Om te voorkomen dat dieren onnodig worden gebruikt voor proeven, waarbij van te voren mag worden aangenomen dat een middel niet werkzaam is, wordt gebruik gemaakt van een beslisboom (zie bijlage 'Beslisboom Figuur 1 Project 2019-0044'). Daarnaast wordt enkel de gunstige middelen, blijkend uit de resultaten van de acute in vivo/ex vivo experimenten, verder onderzocht in de chronische in vivo experimenten (zie bijlage Figuur 4 Project 2019-0044). **De experimenten uit DAP 1 (acuut in vivo) en DAP 3 (acuut ex vivo) zullen parallel aan elkaar worden uitgevoerd. De resultaten die worden verkregen uit deze twee experimenten zullen beslissen of de medicamenteuze therapie verder wordt onderzocht in de (chronische in vivo) DAP 2 experimenten.**

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 1 | Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten. |
| 2 | Ontwikkeling van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten. |
| 3 | Directe effecten van interventies op de ontwikkeling van microvasculaire schade en intramyocardiale hemorrhagie tijdens ischemie-reperfusie in rattenharten. |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
AVD103002016774-5 (voorheen AVD114002016774)
2. Titel van het project:
Bestudering van de ontstaanswijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct
3. Titel van de NTS:
Bestudering van de ontstaanswijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct
4. Type aanvraag:
Wijziging van vergunning met nummer AVD103002016774
5. Contactgegevens DEC:
naam DEC: RUDEC
telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - x ontvangen door DEC: 02-07-2020
 - x aanvraag compleet: op 16-10-2020 is een extra bijlage (3.4.4.3) toegevoegd aan het wijzigingsverzoek
 - x in vergadering besproken: 07-07-2020 en 22-10-2020
 - o anderszins behandeld:
 - x termijnonderbreking(en) van 20-07-2020 tot 16-10-2020 en van 28-10-2020 tot 05-11-2020/16-11-2020
 - o besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen:
 - x aanpassing aanvraag: 16-10-2020 en 05-11-2020/16-11-2020
 - x advies aan CCD: 19-11-2020
7. Afstemming IvD
De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 20-07-2020
 - Datum antwoorden: 07-10-2020
 - Gestelde vragen en antwoorden:
 - Welke resultaten heeft u al behaald tot nu toe? Is de toevoeging aan het project vooral gestoeld op nieuwe literatuur, of heeft u eigen data (uit DAP1) waaruit blijkt dat de behandeling met bepaalde middelen wel of niet succesvol is?
Antwoord: De resultaten die tot op heden behaald zijn, hebben geleid tot een verbetering en stabilisatie van het praktisch handelen tijdens de experimenten. Dit omvat onder andere het

optimaliseren van de mechanische beademing en anesthesieprotocol, het behoud van een stabiele lichaamstemperatuur, het verbeteren van de techniek van de linker kransslagader (LAD; left anterior descending artery) ligatie omwille van het verkrijgen van een gepaste mate van myocardschade (dit kan beoordeeld worden door middel van non-invasieve cardiovasculaire imaging en/of speciale infarct kleuringen).

Uitbreiding van het protocol is gebaseerd op nieuwe inzichten verkregen tijdens bezoeken aan andere laboratoria waar ze soortgelijke experimenten uitvoeren maar met andere primaire uitkomstmaten (10.2 .e. en g Acute experimenten, omvattend de acute in vivo experimenten (DAP [1]) en ex vivo experimenten (DAP [3]) geven inzicht in de mogelijke pathofysiologie en mechanismen van de ziekte. Daarnaast geven chronische experimenten een goed inzicht in cardiale (dys-)functionele karakteristieken van de ziekte (zoals resterende pompkracht van het hart). Met deze redenen hebben wij er voor gekozen om ons project uit te breiden met drie tijdspunten (t = 24 tot 48 uur, t = maximaal 7 dagen).

- Wat zijn de entree-criteria voor het testen van de langere termijn effecten van middelen? Een onderbouwing voor het gebruik van juist deze (selectie van) middelen in de toegevoegde DAP ontbreekt.

Antwoord: In de gereviseerde versie van de DAP hebben we nadere uitleg gegeven over de entree-criteria voor de chronische experimenten. Er is gekozen om te starten met onderstaande drie middelen in dierproef [2] omdat zij direct de vaatpermeabiliteit / vaatintegriteit (microcirculatie, endotheel cellen) reguleren. Zo is behandeling met imatinib (proteïnekinaseremmer) geassocieerd met een behouden microcirculatoire perfusie in een cardiopulmonale bypass rat model (Koning et al., Br J Anaesth 2018). Het aangrijpen op aquaporines werkt beschermend op endotheelcellen en de bloed-brein barrière in een intracerebrale bloeding (IHC) rat model (Tianyang et al, J Biol Chem, 2018). Aangrijpen op angiopoietin-like proteïns heeft ook een beschermend effect op de bloed-brein barrière en vaatpermeabiliteit in een muis cerebraal ischemie-reperfusie model (Lai et al, Neurochem Int, 2008). Echter, van bovenstaande stoffen is niet bekend of het een positief effect heeft in een myocardiaal ischemie-reperfusie (AMI) rat model.

- Uit de strategiebeschrijving van het gewijzigde projectvoorstel blijkt niet dat DAP2 pas na DAP1 wordt gedaan. De commissie is van mening dat dit een logische volgorde zou zijn, aangezien de experimenten in DAP2 veel belastender zijn voor de dieren. Van de te testen middelen zou daarom al bekend moeten zijn dat zij een positief effect zullen hebben op schade aan coronaire microvasculatuur. Dit zou duidelijker naar voren moeten komen.
Antwoord: De chronische experimenten zullen enkel toegepast worden op de middelen die succesvol blijken uit de acute in vivo experimenten (DAP [1]) en/of de ex vivo Langendorff experimenten (DAP [3]). De mogelijkheid is aanwezig dat de gekozen middelen een gunstig effect hebben op microvasculaire schade, maar niet op infarct grootte, of andersom. Daarom wordt er parallel aan de acute in vivo experimenten bepaald wat het effect van de middelen is op infarct grootte in ex vivo experimenten.

Indien de stoffen tijdens de ex vivo én acute in-vivo proeven geen succesvolle verandering in de gedefinieerde uitkomstparameters veroorzaken, dan zullen wij deze middelen niet verder onderzoeken in DAP [2].

- Kunt u in de strategiebeschrijving ook duidelijker onderbouwen waarom u naar deze twee tijdspunten in de nieuwe DAP wil kijken?

Antwoord: In de nieuwe DAP kijken we naar drie nieuwe tijdspunten, namelijk 1) 24 uur, 2) 48 uur en 3) 7 dagen na myocard infarct. De reden zijn als volgt.

Allereerst willen we het grote vraagstuk beantwoorden wat het beloop is van MVI en IMH na myocard infarct. Dus wat gebeurt er acuut (24/48 uur) en chronisch (7 dagen) na myocard infarct met MVI en IMH. Ten tweede willen we weten wat het effect van de medicamenteuze therapieën zijn op 1) IMH en MVI, en 2) hart functie en infarct grootte. IMH en MVI worden het meest zichtbaar op 24 en 48 uur na myocard infarct. Hartfunctie en infarct grootte zijn de beste voorspellers van ziekteprognose als ze maximaal 7 dagen na myocard infarct worden gemeten in de rat. Daarom is er gekozen voor deze drie tijdstippen.

Deze redenen zijn verder uitgelegd en onderbouwd in DAP [2], kopje 2A 'Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters; 'Tijdstippen''.

- DAP2, A2: De handelingen voor de non-invasieve beeldvorming (CMR en SPECT) zijn nog niet beschreven, evenmin als de duur ervan.
Antwoord: Voor de non-invasieve cardiale beeldvorming zullen de dieren een staartcanule krijgen om contrastvloeistof en/of tracers toegediend te kunnen krijgen. Cardiale beeldvorming vindt plaats onder algehele anesthesie. Om verschillende, uitgebreide images te maken zal de non-invasieve beeldvorming maximaal 120 minuten in beslag nemen. Voordat het proefdier ontwaakt, wordt de staart canule verwijderd. Deze non-invasieve beeldvorming maakt dat het project veel beter naar de kliniek te transleren is.

- DAP2, B: U zult drie interventies testen, en gebruikt daarbij telkens twee placebogroepen (bij de groepen A en B). Zou het niet mogelijk zijn om de resultaten van de placebogroepen van één interventie voor meerdere interventies te gebruiken, en op die manier uw doelstellingen te behalen met minder dieren?
Antwoord: Het is mogelijk om de 3 interventie groepen te vergelijken met 1 placebogroep. Dit is aangepast in deze nieuwe versie.

- DAP2, I: Er wordt een hartinfarct aangebracht onder narcose bij de ratten. De commissie neemt aan dat het welzijn van dieren die daarna uit hun narcose ontwaken hierdoor is aangetast. Graag alle bronnen van ongerief (ook de imaging) hier vermelden.
Antwoord: In de nieuwe DAP is de mate van ongerief aangepast/toegevoegd voor de peroperatieve en postoperatieve momenten. Postoperatief wordt gebruik gemaakt van het recovery protocol die algemeen wordt gebruikt bij 0.2 g eno

- DAP2, K: Is het ongerief wel goed ingeschat voor de dieren die na de operatie nog uitvallen? Uw beschrijving van humane eindpunten doet vermoeden dat niet kan worden uitgesloten dat de dieren mogelijk ernstig ongerief zullen ondervinden voordat ze uit de proef worden genomen.
Antwoord: In de nieuwe DAP zijn de humane eindpunten waar rekening mee wordt gehouden en de mate van ongerief aangepast.

- Datum vragen: 28-10-2020
- Datum antwoorden: 05-11-2020 / 16-11-2020
- Gestelde vragen en antwoorden: :

Project Proposal

- 3.4: Wat is de rationale voor het toevoegen van de Langendorff-experimenten (DAP3)? Wat zult u precies uitzoeken met dit model? Uit de strategiebeschrijving van het project blijkt

onvoldoende duidelijk wat de toegevoegde waarde is van deze experimenten. Kunnen de keuzes voor DAP2 net zo goed alleen gebaseerd worden op de uitkomsten van DAP1, zoals u eerst van plan was? U meldt in het amendementsformulier dat met behulp van de uitslagen van DAP3 er beter onderbouwde keuzes gemaakt kunnen worden in de uitvoering van DAP2. Het is nog niet helder voor de DEC hoe de resultaten uit DAP3 deze keuzes zullen kunnen versterken. Kunt u dit concreter uitleggen? Het toevoegen van de Langendorff-experimenten leidt niet tot het gebruik van minder dieren voor de langlopende *in vivo* experimenten van DAP2. De commissie kan nu moeilijk beoordelen of uw onderzoek voldoet aan de vereiste van vermindering.

Antwoord: Om het mechanisme en ontstaanswijze van bloedingen in het hart na een hartinfarct te kunnen begrijpen, dienen we de hart- en niet-hart-componenten van elkaar te scheiden. Het gebruik van een ex vivo myocardiaal infarct model zorgt dat we directe hart effecten kunnen bestuderen en zodoende mechanismes kunnen herleiden naar het hart of juist naar systemische/circulatoire elementen. Dit geeft ons naast 1) inzicht in de causaliteit van processen die leiden tot ischemie-reperfusie schade ook 2) meer kennis over de werking van de te toetsen (medicamenteuze) therapieën (direct/non-direct effect op het hart). Deze vernieuwde uitleg is toegevoegd aan 3.4 projectaanvraag.

Binnen deze studie dienen wij te onderzoeken in hoe verre micro-vasculaire schade leidt tot het ontstaan van ischemie-reperfusie schade. Het is hiervoor noodzakelijk om het effect van de (medicamenteuze) therapieën op infarct grootte en uitscheiding schademarkers te meten. We dienen namelijk te weten of micro-vasculaire schade en de verlaging ervan door de voorgestelde therapieën daadwerkelijk gecorreleerd zijn met infarct grootte en uitscheiding schademarkers; de meest geaccepteerde voorspellers van prognose na myocardiaal infarct. Deze uitleg is toegevoegd aan 3.4 projectaanvraag.

De keuze voor een Langendorff ischemie-reperfusie model in plaats van het in vivo ischemie-reperfusie model uit DAP 2 om infarctgrootte te meten heeft meerdere redenen:

- 1) Ten eerste heeft de Langendorff de voorkeur omdat de variatie tussen infarct groottes in dezelfde groepen minder is dan in het in vivo model, gezien de infarct wordt geïnduceerd door globale en niet regionale ischemie. Er zullen daarom minder dieren nodig zijn in het Langendorff model in vergelijking met de in vivo ischemie-reperfusie model uit DAP2.*
- 2) Ten tweede kunnen we middels het Langendorff model functioneel het linkerventrikel bestuderen door middel van systolische en diastolische druk in de linker ventrikel en de perfusiedruk in de coronaire vaten. Belangrijk is dat we deze metingen continu kunnen verrichten tijdens de ischemie en de reperfusie fases in het Langendorff model. Zo kunnen we ook meer begrip krijgen over de ontstaanswijze van micro-vasculaire schade en de mechanismes van medicamenteuze therapieën tijdens deze twee afzonderlijke momenten van een myocardiaal infarct.*
- 3) Ten derde kunnen we middels het Langendorff model de directe en non-directe (systemische) cardiale effecten van de therapieën onderscheiden van elkaar. Indien in de ex vivo Langendorff experimenten de therapie een effect blijkt te hebben, dan kunnen we zeggen dat het medicijn direct op het hart aanhecht om ischemie-reperfusie schade te veranderen. Dit is van belang om te bekijken om de onderliggende werkingsmechanismes van de (medicamenteuze) therapie te kunnen begrijpen.*

Deze redenen zijn toegevoegd aan DAP 3 2A 'Experimentele Aanpak'.

In DAP 1 wordt in de eerste instantie middels een 'proof-of-concept' bekeken of (een van) de medicijnen werken. Dit betekent dat het medicijn wordt toegediend vóórdat ischemie plaatsvindt. Dit wordt gedaan om er zo zeker van te zijn dat het medicijn aanwezig is wanneer de pathologische processen van ischemie en reperfusie gebeuren. Zo kan men iets zeggen over de effectiviteit van een medicijn tegen ischemie en reperfusie schade.

Als het medicijn blijkt te werken, dan betekent dit niet direct dat het een effectieve therapie is

om te gebruiken bij acute myocard infarct, want in de werkelijkheid bereiken de patiënten pas de cardioloog tijdens de ischemie of de reperfusie fase. Daarom dienen naast de proof-of-concept experimenten, ook experimenten gedaan worden naar de timing van medicatie toediening om te onderzoeken bij welke patiënten het gunstig kan zijn om de medicatie toe te dienen.

Het gebrek aan deze kritische en zeer relevante timing-experimenten in preklinische experimenten is een van de redenen waarom talloze voorgaande therapieën tegen myocardiaal infarct in de klinische setting geen effect blijken te hebben, terwijl in de preklinische setting deze wel succesvol bleken. Daarom dienen wij ook timing experimenten uit te voeren naast de proof-of-concept experimenten. Het vaststellen van ischemie-reperfusie schade middels de gouden standaard bepaling (infarct grootte) en de keuze voor de optimale timing van therapie toediening worden dus onderzocht in het ex vivo Langendorff model in plaats van de in vivo experimenten (DAP 1 of 3). In het ex vivo model zullen er minder dieren per groep nodig zijn om significante effecten te kunnen waarnemen (14 vs. 19 dieren per groep), waardoor de Langendorff experimenten leiden tot vermindering van het gebruik van het aantal dieren. Alle bovenstaande onderbouwingen en verklaringen zijn tevens beschreven in de gereviseerde DAP 3, 2A 'Vervanging, vermindering en verfijning'.

- Bij 3.4.3 wordt gevraagd de fasering in de uitvoering te beschrijven. Uit de tekst van uw amendementverzoek blijkt dat u eerst de experimenten van DAP1 en DAP3 (parallel) zult uitvoeren, en daarna pas DAP2. Dit komt niet duidelijk naar voren in de tekst van de projectaanvraag.

Antwoord: In de gereviseerde versie van de projectaanvraag bij 3.4.3 is naast de schematische weergave (figuur 4) nu ook tekst toegevoegd om de fasering van uitvoering van experimenten te verhelderen.

Concluderend, dit onderzoek wordt in de acute in vivo en acute ex vivo Langendorff ischemie-reperfusie modellen onderzocht zodat de systemische en direct cardiale (non-systemische) mechanismes van ischemie-reperfusie schade, micro-vasculaire schade en intramyocardiale hemorragie van elkaar kunnen onderscheiden kunnen worden. Zodoende kunnen de werkingsmechanismes van de therapieën beter begrepen worden. Voorheen was er geen expertise in de Langendorff model binnen onze groep waardoor we ons alleen hadden gericht op het in vivo model. Door de aanvulling van een nieuwe collega post doc met expertise in het Langendorff model, kunnen we nu beide methodes toepassen. Kortom, deze twee verschillende modellen (in vivo/ex vivo) werken synergetisch en zijn beide noodzakelijk in het onderzoeken van de processen binnen myocardiale ischemie-reperfusie, micro-vasculaire schade en intramyocardiale hemorragie.

- Het aantal dieren in de NTS is op 16-11-2020 in overeenstemming gebracht met de aantallen in de bijlages.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging van vergunning met nummer AVD1030020186045. De DEC wijst erop dat het oorspronkelijke advies over deze aanvraag is opgesteld door een andere DEC. Aanvullend advies van de RUDEC over de wijziging is, in blauwe tekst, ingevoegd in de tekst van het oorspronkelijke advies hieronder.

3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Middels het wijzigingsverzoek worden twee typen experimenten toegevoegd aan de aanvraag: uitgebreidere *ex vivo* experimenten in een myocard infarct model om directe effecten van medicatie op het hart na ischemie-reperfusie te bestuderen (hartfunctie met systolische en diastolische druk in de linker ventrikel en de perfusiedruk in de coronaire vaten, effecten van timing van medicatietoediening); en langdurigere *in vivo* experimenten om het effect van medicatie op schade van ischemie-reperfusie te meten (microvasculaire schade, intramyocardiale hemorragie, uiteindelijke infarctgrootte en rest hartfunctie, gemeten met herhaalde CMR, biomarkers voor schade en microscopische analyse). De toegevoegde experimenten vormen naar de mening van de DEC een logische aanvulling op de reeds beschreven experimenten, en dragen zowel bij aan het behalen van de oorspronkelijke directe doelstelling van het onderzoek (onderzoeken welke mechanismen verantwoordelijk zijn voor endotheelschade en in hoeverre enkele veel voorgeschreven medicijnen (o.a. bloedverdunners) van invloed zijn op het optreden van intramyocardiale hemorragie (IMH) bij ratten) als aan de uiteindelijke doelstelling (bijdragen aan de ontwikkeling van behandelingen die IMH na een dotterbehandeling kunnen voorkomen of genezen).
2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: n.v.t. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doe/categorieën fundamenteel en toegepast onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

Belangen en waarden

4. Patiënten die voor een acuut hartinfarct behandeld worden met een dotterbehandeling krijgen vaak te maken met permanente schade aan het hart. In deze patiënten kan de doorbloeding van de kleine haarvaatjes van het hart deels verloren gaan, waardoor de aanvoer van zuurstof ernstig wordt beperkt (no-reflow) en waarbij rode bloedcellen buiten de bloedbaan treden en zich ophopen in de hartspier zelf (intramyocardiale hemorragie of IMH), wat gepaard gaat met een ziekte- en sterfte. Het directe doel van deze studie is de ontstaanswijze van IMH te doorgronden. Men gaat onderzoeken wat het effect is van endotheel-modulerende middelen (interne factoren) en antistollingsmiddelen (externe factoren zoals o.a. bloedverdunners) op het optreden van intramyocardiale hemorragie (IMH). Het uiteindelijke doel van de studie is om meer kennis te verkrijgen over de basismechanismen die verantwoorde/ijk zijn voor het ontstaan van IMH. Deze nieuwe kennis is in de toekomst te gebruiken voor de ontwikkeling van een adequate behandeling tegen IMH.

Het betreft hier fundamenteel en toegepast onderzoek. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

De experimenten die met de voorgestelde wijziging worden toegevoegd aan de projectaanvraag geven enerzijds (bijlage 3.4.4.3) meer inzicht in de directe effecten van de medicatie op het hart, en geven een indicatie van het tijdstip na een hartinfarct waarop de toegediende medicatie nog leidt tot vermindering van hartschade. Dit is van belang voor het vertalen van de resultaten uit deze studie naar een experimentele behandeling van patiënten. Anderzijds (bijlage 3.4.4.2) maken zij duidelijk wat de effecten van systemische toediening van de medicijnen is op het herstel na ischemie-reperfusie/experimenteel hartinfarct bij ratten. Het directe doel van de oorspronkelijke projectaanvraag kan door deze toevoegingen uitgebreider en nauwkeuriger worden onderzocht, en de resultaten worden relevanter voor het bereiken van het uiteindelijke doel in de toekomst.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op de ontstaanswijze van IMH zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.

De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van een behandeling tegen IMH, welke IMH kan voorkomen of genezen. Hierdoor zal het welzijn van de patiënten en hun kwaliteit van leven verbeteren. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: n.v.t. De aanvrager maakt geen melding van onbedoelde nadelige effecten op het milieu. Er is geen aanleiding voor de DEC om te verwachten dat die er zullen zijn.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

De verhuizing van de onderzoeksgroep maakt het mogelijk om nauwer samen te werken met de afdeling Radiologie waardoor *in vivo* CMR bepalingen gedaan kunnen worden, en de functie van het hart kan *ex vivo* uitgebreider onderzocht worden omdat er nu een medewerker beschikbaar is die veel expertise heeft op dit gebied.

8. De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen

inzichten kunnen op termijn bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling voor IMH. De gevraagde looptijd van 3 jaar acht de DEC reëel, gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek. De commissie heeft de onderzoeker gevraagd de volgorde van de experimenten en de selectiemomenten duidelijker te beschrijven. Het antwoord heeft de commissie overtuigd dat de onderzoekers een logische volgorde hanteren, en dat zowel de *ex vivo* experimenten beschreven in bijlage 3.4.4.3 als de terminale experimenten beschreven in bijlage 3.4.4.1 belangrijke informatie opleveren op grond waarvan middelen geselecteerd worden die getest worden in de *in vivo* experimenten (bijlage 3.4.4.2). Tezamen zullen deze experimenten resultaten opleveren die op termijn kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een behandeling voor IMH. Om deze experimenten onder deze vergunning uit te kunnen voeren is de looptijd al eerder middels een ander wijzigingsverzoek aangepast naar 5 jaar.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding. De dodingsmethode is volgens de bijlage IV richtlijn. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
11. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd. Alle procedures worden uitgevoerd onder volledige verdoving en aan het eind komen de dieren niet meer bij bewustzijn, alle dieren in deze projectvergunningaanvraag ondergaan "terminaal" ongerief. Met de voorgestelde wijziging worden twee typen dierproeven toegevoegd. Het ongerief voor de 244 extra dieren die onder anesthesie worden gedood voor het verkrijgen van een orgaan (het hart) voor *ex vivo* experimenten is ingeschat als licht (bijlage 3.4.4.3). Voor de 162 extra dieren die onder anesthesie een experimenteel hartinfarct ondergaan en daarna weer ontwaken (bijlage 3.4.4.2) is het ongerief ingeschat als matig. De dieren krijgen adequate pijnstilling rondom de operatie. Na de operatie gaan de dieren maximaal drie maal onder anesthesie voor non-invasieve beeldvorming van het hart waarbij een tijdelijke canule wordt ingebracht in de staartvene voor toediening van medicatie, contrastvloeistof, tracers, of afname van bloedmonsters. Direct na de laatste scan worden de verdoofde ratten gedood. De commissie is het eens met de ongeriefinschatting van de aanvrager. In totaal worden er 1166 ratten gevraagd voor dit onderzoek, met terminaal ongerief voor 65% van de dieren, licht ongerief voor 21% en matig ongerief voor 14% van de dieren.
12. De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren onder volledige anesthesie met aanvullende pijnstilling ingrepen ondergaan en aansluitend worden gedood. De integriteit van de dieren die middels dit wijzigingsverzoek worden toegevoegd aan de projectaanvraag wordt aangetast doordat ze de hiervoor genoemde ingrepen aan het hart ondergaan (experimenteel hartinfarct) en daarna weer bijkomen en tot 7 dagen in leven blijven waarbij ze enkele malen verdoofd worden om een scan van het hart te kunnen maken, of omdat ze zonder voorafgaande handelingen worden gedood om het hart uit te kunnen nemen en te gebruiken voor *ex vivo* experimenten.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. Het experiment wordt gestopt indien meer dan 25% van de dieren uitvalt door sterfte tijdens de operatie. Gezien de volledige anesthesie zal dit het welzijn/ongerief van de dieren niet aantasten. De criteria voor humane eindpunten voor de dieren die weer bijkomen na het experimentele hartinfarct (162 dieren, bijlage 3.4.4.2) zijn goed gedefinieerd. Dieren die ondanks pijnstilling te hoog (> 2) scoren op de *rat grimace scale*, of dieren die 2 scoren en daarbij ademhalingsmoeilijkheden vertonen, worden gedood. De aanvrager verwacht dat 25% van de dieren uit deze bijlage zal uitvallen door ritmestoornissen tijdens en direct na de operatie of

door het bereiken van deze criteria. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten. Die zullen ernstig ongerief voor de dieren kunnen voorkomen.

3V's

14. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk. Voor deze studie op het gebied van IMH is een complex biologisch systeem, waarin interactie tussen cellen plaatsvindt, essentieel. Hart- en vaatziekten en de reeks opeenvolgende veranderingen die optreden rondom een acuut hartinfarct zijn zeer complex. Hierbij spelen niet alleen de eigenschappen van het weefsel een rol, maar ook specifieke veranderingen in bloeddruk, stroomsnelheid en instroom van bloedplaatjes en afweercellen. Doordat al deze elementen van invloed zijn, kan het geheel niet goed worden nagebootst buiten het lichaam. Daarom zijn er proefdieren nodig om dit onderzoek uit te voeren.

De keuze voor het gebruik van ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Er is gekozen voor een hartinfarctmodel met ratten, omdat ratten een hart hebben dat goed vergelijkbaar is met dat van de mens. Het model wordt wereldwijd gebruikt en is veelvuldig beschreven in wetenschappelijke literatuur. Bovendien is er in de onderzoeksgroep ruime ervaring met dit model.

De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Door gebruik te maken van een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Daarnaast zullen de dieren deels als eigen controle worden gebruikt, waardoor het aantal benodigde dieren verder wordt teruggebracht. Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 760 ratten en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

Middels de voorgestelde wijziging worden 406 dieren toegevoegd aan de projectaanvraag om aanvullende experimenten uit te kunnen voeren waarmee de hoofddoelstelling (onderzoeken welke mechanismen verantwoordelijk zijn voor IMH en welke medicatie van invloed is hierop) uitgebreider en nauwkeuriger onderzocht kan worden. Dezelfde maatregelen om ervoor te zorgen dat er niet teveel of te weinig dieren worden gebruikt zijn ook van toepassing op de toegevoegde experimenten.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. De operatieve ingreep zal onder narcose en met pijnbestrijding worden uitgevoerd. De dieren zullen aan het eind van de ingreep -terwijl zij nog onder narcose zijn- worden gedood, om het hart uit te kunnen nemen voor verdere analyse.

De experimenten die met dit wijzigingsverzoek worden toegevoegd bevatten dezelfde operatie onder passende anesthesie en pijnbestrijding, maar de dieren komen nu wel weer bij uit de narcose. De hartfunctie van deze dieren zal op niet-invasieve wijze onder anesthesie worden onderzocht, en de duur van de beeldvorming wordt zo kort mogelijk gehouden.

Een deel van de dieren die worden toegevoegd middels dit wijzigingsverzoek wordt gedood zonder voorafgaande handelingen.

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

dat onnodige duplicatie plaatsvindt: n.v.t. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Men zal gebruik maken van mannelijke ratten. In vakliteratuur wordt beschreven vrouwelijke ratten minder ischemie-reperfusieschade ondervinden, voornamelijk door de cardioprotectieve werking van oestrogeen (Zhai et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000; Boe et al., J Pharmacol Exp Ther, 2005; Dechamps et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009). Dit maakt vrouwelijke dieren minder geschikt om het effect van de beschreven middelen te testen, daarom heeft men besloten alleen mannelijke dieren te gebruiken. De DEC onderschrijft deze keuze. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.
19. Het gaat hier om terminale experimenten, alle dieren worden onder volledige anesthesie (met aanvullende pijnstilling) gedood. Om de effecten van de interventie op het hart goed te kunnen bestuderen, dient het hart uit het lichaam te worden genomen. De dieren die in eerste instantie weer bijkomen uit anesthesie na het experimentele hartinfarct (bijlage 3.4.4.2), worden uiteindelijk (na maximaal 7 dagen) gedood om dezelfde reden als hierboven vermeld.
20. Adoptie of hergebruik is niet mogelijk omdat er post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen. De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.l van de Wod. De voorgestelde wijziging is verwerkt in een nieuwe NTS.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de basismechanismen voor het ontstaan van IMH en daarmee het beschikbaar komen van een behandeling voor patiënten met IMH het gebruik van 760 1166 ratten in de dierproef die daarvan terminaal, licht of matig ongerief ondervinden?
2. De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en alle 65% van de dieren ondervindt terminaal ongerief, 21% van de dieren ondervindt licht ongerief en 14% van de dieren ondervindt matig ongerief. Dat leidt tijdens de dierproef tot gering of matig nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: Veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten/maatschappij bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van een behandeling voor IMH.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 760 1166 ratten die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Een groot deel van de patiënten die voor een acuut hartinfarct behandeld worden met een dotterbehandeling, heeft permanente schade aan het hart. In deze patiënten kan intramyocardiale hemorragie (IMH) optreden, wat zorgt

voor ziekte en sterfte. Voor de ontwikkeling van een behandeling voor IMH is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is de ontstaanswijze van IMH te doorgronden. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling tegen IMH, is afgewogen tegen het, als terminaal, licht of matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal ~~760~~ 1166 ratten en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.
 - (1) Het maatschappelijk en wetenschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de ontstaanswijze van IMH en zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling voor IMH.
 - (2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal ~~760~~ 1166 dieren en het daarbij verwachte terminale, lichte of matige ongerief.

Met het wijzigingsverzoek worden experimenten toegevoegd die matig ongerief voor een deel van de ratten veroorzaken, omdat zij tot maximaal 7 dagen in leven blijven na een experimenteel hartinfarct. Op die manier kan het effect van medicatie op het herstel (en tijdens het herstel) na een hartinfarct gemeten worden. Deze resultaten zijn van groot belang voor het ontwikkelen van een behandeling die de hartschade en het herstel daarvan na een dotterprocedure kunnen verminderen c.q. verbeteren. Van belang voor de ethische afweging is dat, naar de mening van de RUDEC, het translationele belang van dit onderzoek voor patiënten daardoor toeneemt. De DEC is dan ook van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van matige 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 het wijzigingsverzoek te honoreren.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. De DEC heeft bij de beoordeling van dit project geen knelpunten/dilemma's geconstateerd.



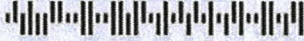
> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

T.a.v. 02.e.eng

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002016774-5

Bijlagen

3

Datum 17 december 2020

Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 02.e.eng

Op 2 juli 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bestudering van de ontstaanwijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct" met aanvraagnummer AVD103002016774-5. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning is afgegeven voor de periode van 20 februari 2017 tot en met 1 januari 2020.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 19 november 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 16 oktober 2020 heeft u uw aanvraag gewijzigd. De wijziging betrof het toevoegen van een extra bijlage dierproeven.

Op 14 december 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op een aanpassing in de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

17 december 2020

Aanvraagnummer:

AVD103002016774-5

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, 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 93118, 2509 AC 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.