

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202216336	openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning, d.d. 17-08-2022				X		X		X	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				X				X	
3	Bijlage dierproeven bij aanvraag				X				X	
4	NTS bij aanvraag			X						
5	E-mail CCD aan DEC verzoek om advies, d.d. 17-08-2022				X		X		X	
6	DEC-advies, d.d. 02-11-2022				X		X		X	
7	Projectvoorstel na DEC advies				X				X	
8	Bijlage dierproeven na DEC advies				X				X	
9	NTS na DEC advies			X						
10	Adviesnota aan CCD, d.d. 8-11-2022 met opmerkingen				X		X		X	X
11	Adviesnota aan CCD, d.d. 01-12-2022				X		X		X	X
12	E-mail CCD aan vergunninghouder, 18-11-2022				X		X		X	
13	Reactie op vragen CCD				X		X		X	
14	Bijlage dierproeven na CCD vragen				X				X	
15	NTS na CCD vragen			X						
16	E-mail intern beraad over beschikking, d.d. 05-12-2022				X		X		X	X
17	E-mail intern beraad over beschikking, d.d. 06-12-2022				X		X		X	X
18	Beschikking d.d. 07-12-2022				X		X		X	
19	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over projectvergunning, d.d. 12-12-2022				X		X		X	



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1

Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	5.1 lid2h			
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen				
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3				
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1				
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2				
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h			
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel 5.1 lid2e	Voorletters 5.1 lid2e	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2e			
		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				
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	5.1 lid2h			50
		Postcode en plaats	5.1 lid2h			
		Postbus, postcode en plaats	5.1 lid2h			
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e			<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	5.1 lid2e			
		Afdeling	5.1 lid2h			

	Telefoonnummer	5.1 lid2e
	E-mailadres	
1.5 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.6 (Indien van toepassing) 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.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	5.1 lid2e, 5.1 lid2h
	E-mailadres	5.1 lid2h
1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1 Gaat uw aanvraag over een wijziging op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2 Gaat uw aanvraag over een melding op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> 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 01 - 09 - 2022 Einddatum (t/m) 31 - 08 - 2025
3.2 Wat is de titel van het project?	Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Effecten van actieve stoffen in voedingssupplementen die werking van het sympathisch zenuwstelsel kunnen nabootsen
3.4	Naam DEC 5.1 lid2h

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

Postadres

E-mailadres

5.1 lid2h

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	Afdeling:	
Straat:		Huisnummer:
Postcode:	Plaats:	
Postbus:	Postcode:	Plaats:
E-mail:		

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- | | |
|--|---------------------------------|
| <input checked="" 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 de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

5.1 lid2e

5.1 lid2h

17 - 08 - 2022

5.1 lid2e



Formulier

Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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 2.1 aangekruiste categorieën.

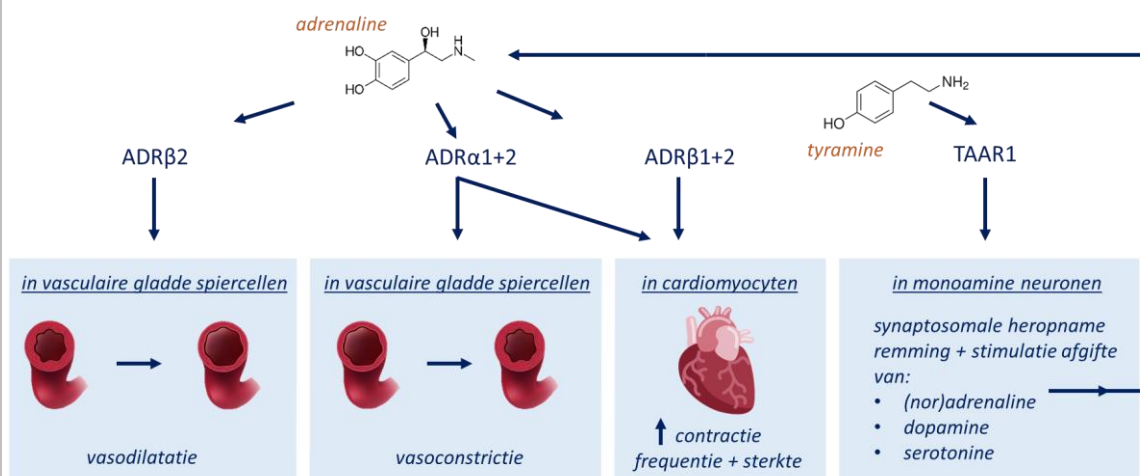
Aanleiding

Op de Nederlandse markt zijn verschillende voedingssupplementen verkrijgbaar die gericht zijn op sportprestatiebevordering. Deze supplementen bevatten vaak farmacologisch actieve stoffen om zo deze beloofde eigenschappen te kunnen bewerkstelligen. Recentelijk heeft de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) 416 voedingssupplementen onderzocht, waarbij in 64% van de supplementen één of meerdere farmacologisch actieve stoffen zijn gevonden, waaronder planttoxines, geneesmiddelen en gemodificeerde analogen hiervan ¹. De

aanwezigheid van deze stoffen was niet altijd vermeld op de verpakking. Ook waren concentraties van deze stoffen niet altijd te achterhalen of weken de gemeten concentraties af van de productspecificatie. Bijvoorbeeld, de maximale gemeten dosis voor de actieve stof 1,3-dimethylamylamine (DMAA) was 143 mg. Dit is ongeveer 35 keer meer dan de aanbevolen maximale dagelijkse veilige dosis van 4 mg ^{1,2}. Dit brengt mogelijk gezondheidsrisico's met zich mee, aangezien voor veel gedetecteerde stoffen geen toxicologische gegevens beschikbaar zijn.

Achtergrond

Het grootste gedeelte van de door de NVWA aangetroffen farmacologisch actieve stoffen hebben een vergelijkbare moleculaire structuur als de "trace amines" en catecholamines. Zo zijn er amfetamine- en synefrine-achtige stoffen aangetroffen (bijv. fenethylamine, methylsynefrine, beta-methylfenethylamine (BMPEA), dimethylfenethylamine (DMPEA)). Van amfetamine en synefrine is bekend dat zij sympathomimetische effecten vertonen, wat inhoudt dat ze de effecten van endogene agonisten, zoals (nor)adrenaline en dopamine, op het sympathische zenuwstelsel nabootsten. Directe effecten zijn de activatie van α - en β -adrenerge receptoren. Indirect kunnen deze stoffen de heropname van endogene agonisten (catecholamines) beïnvloeden door te binden aan trace amine geassocieerde receptoren (bijv. TAAR1). Deze effecten kunnen leiden tot een sympathische activatie van hart en bloedvaten, waardoor verhoging van bloeddruk en hartslag kan plaatsvinden (zie Figuur 1). Het scala aan farmacologisch actieve stoffen in de supplementen is echter veel groter, waarbij door de jaren steeds meer nieuwe stoffen (die vaak kleine chemische modificaties van reeds bekende en gereguleerde of verboden stoffen bevatten) worden gedetecteerd ^{1,3,4}. Voor veel van deze stoffen zijn toxicologische gegevens en werkingsmechanismen onbekend.



Figuur 1 – Versimpeld schematisch overzicht van directe en indirecte sympathomimetische effecten gereguleerd door adrenerge receptor α 1 (ADRA1), - α 2 (ADRA2), - β 1 (ADRB1), - β 2 (ADRB2) en trace amine geassocieerde receptor 1 (TAAR1).

Ondanks het feit dat farmacologische en toxicologische informatie ontbreekt, worden de supplementen toch op grote schaal gebruikt ⁵. Uit een recentelijk gepubliceerd onderzoek van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) blijkt dat ruim een kwart van de amateursporters voor of na het sporten één of meerdere sportsupplementen neemt ⁵. Meer dan de helft van de gebruikers die deelnamen aan dit onderzoek gaf aan bijwerkingen zoals hoofdpijn, slapeloosheid en hartkloppingen te ervaren. Verschillende casussen laten zien dat het gebruik van deze voedingssupplementen gepaard kan gaan met ernstige gezondheidsklachten. Zeijlon et al. (2022) hebben in een systematische reviewstudie gekeken naar casussen die het gebruik van sportvoedingssupplementen en ernstige gezondheidsklachten rapporteerden ⁶. Zij hebben 72 casussen bestudeerd waarin het gebruik van 134 verschillende

sportvoedingssupplementen gepaard ging met 37 verschillende negatieve gezondheidsklachten. De meest gerapporteerde ernstige gezondheidsklachten waren onder andere acuut myocardiaal infarct, hartstilstand en hersenbloeding. Vanwege een gebrek aan gegevens is het momenteel niet mogelijk om de risico's en incidenten in cijfers uit te drukken voor de gehele samenleving⁵.

Deze casussen laten zien dat consumptie van voedingssupplementen gericht op bevordering van sportprestaties gepaard kan gaan met zeer ernstige bijwerkingen. In veel gevallen maken de voedingswaren- en geneesmiddelenwetgeving het niet mogelijk om te handhaven¹. Dit komt doordat er voor veel van deze stoffen geen toxiciteitsgegevens beschikbaar zijn. Dit is een ongewenste situatie, omdat hierdoor producten die farmacologisch actieve stoffen bevatten op de markt blijven. Om deze producten van de markt te halen vereist de huidige wetgeving om wetenschappelijk aan te tonen dat producten onveilig zijn. Daarom is het van groot belang om onderzoek te verrichten naar de toxiciteit, effecten en mechanismen van deze stoffen om zo de handhaving op deze producten te stimuleren. De NVWA heeft daarom ook opdracht gegeven dit project uit te voeren.

Cardiovasculaire regulatie door het sympathisch zenuwstelsel

Het sympathisch zenuwstelsel reguleert het cardiovasculair systeem door het veranderen van de perifere vasculaire weerstand, sterkte en frequentie van de hartcontractie en de vasculaire tonus⁷. Een aantal receptoren speelt hierbij een sleutelrol. Bij directe sympathische activatie wordt in dit project gefocust op de adrenerge receptoren (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) en de betrokken werkingsmechanismen. Endogene agonisten van deze receptoren zijn de catacholamines adrenaline en noradrenaline. Indirecte sympathische activatie wordt bestudeerd door de effecten van de farmacologisch actieve stoffen op TAAR1 en bijbehorende mechanismen te onderzoeken. Hierna wordt kort beschreven wat de rol van deze receptoren is bij sympathische regulatie en waar deze receptoren tot expressie komen. Een versimpeld schematisch overzicht is weergegeven in Figuur 1.

- α_1 adrenerge receptoren (activatie sympathisch zenuwstel) komen met name tot expressie in vasculaire gladde spiercellen waar activatie zorgt voor verhoogde vasoconstrictie. In het hart leidt activatie tot een toename in contractiesterkte (inotropie).
- α_2 adrenerge receptoren (activatie sympathisch zenuwstel) komen ook voor in vasculaire gladde spiercellen, maar in kleinere hoeveelheden dan α_1 . Activatie leidt tot vasoconstrictie. Daarnaast is deze receptor onder andere gelokaliseerd in vetcellen waar het de lipolyse remt.
- β_1 adrenerge receptoren (activatie sympathisch zenuwstel) komen het meest tot expressie in het hart waar het zorgt voor chronotrope (toename hartslagsnelheid) en inotrope effecten (toename hartslagsterkte).
- β_2 adrenerge receptoren (activatie sympathisch zenuwstel) komen onder andere tot expressie in vasculaire gladde spiercellen waar activatie zorgt voor vasodilatatie⁷.
- Trace amine geassocieerde receptor 1 (TAAR1) komt vooral intracellulair tot expressie in verschillende monoaminerge breingebieden, waaronder in dopaminerge cellen in de substantia nigra, de nucleus accumbens en de nucleus caudatus⁸⁻¹⁰. Wanneer TAAR1 samen met dopamine-, noradrenaline- of serotoninetransporters is gelokaliseerd, remt TAAR1 activatie de heropname van deze stoffen in de betreffende neuronen (dopamine, noradrenaline en serotonine) door deze transporters te internaliseren. Ook stimuleert het de afgifte van deze neurotransmitters. Hierdoor is de concentratie van deze neurotransmitters in de synaptische spleet gedurende langere tijd verhoogd. Dit leidt onder andere tot indirecte activatie van het sympathisch zenuwstelsel. Zo is dopamine een precursor van noradrenaline en adrenaline, die de eerdergenoemde adrenerge receptoren kunnen activeren¹¹.

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Directe doel

Het directe doel van dit project is om de effecten van "trace-amine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op het sympathisch zenuwstelsel te bestuderen om zo bij te dragen aan de risicobeoordeling en stimulatie van handhaving van deze stoffen. Dit doel zal behaald worden door het voltooien van de volgende subdoelen.

Subdoelen

Directe sympathomimetische effecten van catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen:

- op bloeddruk, hartslagfrequentie en hartslagcontractiekracht *in vivo* in de rat.
- op vaatcontractiliteit bestuderen (*ex vivo*) in mesenteriale weerstandsvaten van de rat.

Indirecte sympathomimetische effecten van "trace-amine"-achtige stoffen in voedingssupplementen:

- op bloeddruk, hartslagfrequentie en hartslagcontractiekracht *in vivo* in de rat bestuderen.
- op TAAR1 expressie in synaptosomen geïsoleerd uit rat hersenen bestuderen.
- op dopamine-, noradrenaline- en serotonine transport bestuderen in synaptosomen geïsoleerd uit rat hersenen.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

Binnen de 5.1 lid2h is er ruime ervaring met het opzetten van *in vivo* dierstudies en myograafstudies met ratten. Deze kennis ligt met name bij de senior onderzoekers. Het is daarom erg belangrijk om deze kennis over te dragen naar de junior onderzoekers. Daarom zullen er pilotstudies uitgevoerd worden om de kennis van de technieken aan deze onderzoekers over te dragen. De onderzoekers zullen opgeleid worden voor de volgende handelingen: (1) het plaatsten van de telemetrieapparatuur in de dieren, (2) het aanbrengen van permanente canules, (3) isolaties van mesenteriale vaten en hersenweefsel, (4) het plaatsen van mesenteriale vaten in een functionerende myograafopstelling en (5) optimalisatie van het bereidingsprotocol voor synaptosomen. De vakgroep heeft de kennis in huis om deze junior onderzoekers op te leiden voor de bovenstaande technieken.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Dit project heeft zowel een maatschappelijk als een wetenschappelijk belang. Het onderzoek van Biesterbos *et al.* (2019) laat zien dat voedingssupplementen gericht op de bevordering van sportprestaties een verscheidenheid aan farmacologisch actieve stoffen kunnen bevatten

waarvan onderzoek naar de veiligheid en werkingsmechanismes ontbreekt¹. Meerdere casussen laten zien dat het gebruik van deze voedingssupplementen aanleiding kunnen geven tot ernstige gezondheidsschade zoals een hersenbloeding of een acuut hartinfarct⁴²⁻⁴⁴. Het is van belang voor de maatschappij dat er onderzoek wordt verricht naar de sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen om enerzijds consumenten beter te kunnen informeren om zo ernstige gezondheidsschade zoals deze te voorkomen en anderzijds om de veiligheidsautoriteiten te ondersteunen bij het uitvoeren van risicobeoordelingen waardoor er gehandhaafd kan worden.

Daarnaast heeft dit project een wetenschappelijk belang. Dit project zal bijdragen aan de kennisontwikkeling van de werkingsmechanismen van de te onderzoeken stoffen en de translatie van deze mechanismen naar fysiologisch relevante effecten. De lijst met farmacologische actieve stoffen die in voedingssupplementen worden gedetecteerd groeit snel. Dit kan verklaard worden doordat voedingssupplement producenten steeds weer nieuwe stoffen ontwikkelen voor gebruik in hun supplementen, doordat zij kleine chemische aanpassingen doen aan bestaande farmacologisch actieve stoffen waardoor er een nieuwe stof ontstaat en de bestaande regulering wordt omzeild. De te onderzoeken stoffen hebben daarom vergelijkbare moleculaire structuren. Deze chemische modificaties kunnen de effecten op het sympathisch zenuwstelsel veranderen en daarom zullen deze gemodificeerde stoffen uitvoerig worden bestudeerd.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

Belanghebbenden in dit project zijn gebruikers van voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering, wetenschappers die in hetzelfde onderzoeksveld werkzaam zijn en overheidsinstanties (zoals de NVWA). In dit project zullen de effecten van farmacologisch actieve stoffen in deze supplementen op het sympathisch zenuwstelsel bestudeerd worden. Dit zal een bijdrage leveren aan de risicobeoordeling van deze supplementen, waarbij de NVWA kan handhaven indien deze supplementen onveilig bevonden worden. Daardoor is de NVWA ook een belanghebbende partij in dit project. De proefdieren hebben weliswaar geen belang bij de uitkomsten van het onderzoek, maar ondergaan wel de effecten van de uitvoering ervan. Daarom is een experimentele aanpak gekozen waarbij de negatieve gevolgen van de experimenten zo beperkt mogelijk gehouden worden. De dieren worden opgeofferd in het kader van het wetenschappelijke en maatschappelijke belang. De resultaten van de studies waarvan de dieren onderdeel van zijn, vormen een fundament om de NVWA handvaten te geven om onveilig bevonden stoffen van de markt te halen.

3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

In Figuur 2 (blz. 9) is de fasering samengevat en schematisch weergegeven. De pijlen geven de volgorde aan waarin de verschillende studies zullen plaatsvinden. Eerst wordt er een literatuurstudie gedaan (1), gevolgd door *in vitro* studies (2). Op basis van de uitkomsten van deze *in vitro* studies wordt een selectie van maximaal 10 stoffen gemaakt om *in vivo* en *ex vivo* te bestuderen (3.1 en 3.2). Hierna worden de verschillende onderdelen van de projectfasering in meer detail beschreven.

Projectfasering

Literatuurstudie

In de eerste fase van dit project is middels een literatuurstudie een overzicht gemaakt van gedetecteerde stoffen in deze voedingssupplementen. Vervolgens zijn stoffen ingedeeld in stofklassen op basis van hun molecuulstructuur. De stoffen uit stofklassen die sympathomimetische effecten vertonen, zoals de fenethylamines en de alkylamines, zijn geselecteerd voor een uitgebreider literatuuronderzoek naar de werkingsmechanismen, toxicokinetiek en toxicodynamiek van deze stoffen.

In vitro studies

Op basis van het overzicht van de gedetecteerde stoffen en de beschikbare toxicologische gegevens zal vervolgens een selectie van stoffen, waarvan weinig tot niets bekend is over werkingsmechanismen en toxiciteit, *in vitro* onderzocht worden. Deze studies zullen voornamelijk gericht zijn op het bepalen van de affiniteit en potenties van de geselecteerde stoffen voor het binden aan en activeren van de α 1-, α 2-, β 1- en β 2- adrenerge receptoren en TAAR1. Dit zijn de voornaamste receptoren die een belangrijke rol spelen bij de cardiovasculaire (bij)werkingen van de farmacologisch actieve stoffen in de supplementen. Concentratie-response relaties van deze stoffen voor receptoren die tot activatie van het sympathisch zenuwstelsel leiden, worden onderzocht met getransfecteerde cellijnen die deze receptoren tot overexpressie brengen. Ook wordt transport van de geselecteerde stoffen over een monolayer van darmcellen (Caco-2 cellijn) gemeten in een transwell systeem. Deze resultaten worden gebruikt om passage over de bloed-hersen-barrière te voorspellen ¹².

Prioritering

De bovenstaande *in vitro* studies worden gebruikt om stoffen te prioriteren. De potentie en effectiviteit waarmee ze de betreffende receptoren activeren, worden gebruikt als voorspeller van hun sympathomimetische effecten in mensen. In de literatuur zijn meer dan 90 verschillende farmacologisch actieve stoffen gerapporteerd in voedingssupplementen gericht op bevordering van sportprestaties (zie Tabel 2, op p. 13-16 van dit document). Voor de *in vitro* studies zullen hiervan minimaal 15 stoffen bestudeerd worden. Deze selectie is gekozen op basis van de vergelijkbare molecuulstructuur als reeds bekende en goed gekarakteriseerde catecholamines (zoals adrenaline, noradrenaline en dopamine) en trace amines (zoals amfetamine) en waarvan nog geen informatie bekend is over hun werkingsmechanisme. Op basis van de molecuulstructuur van deze stoffen wordt verwacht dat zij vergelijkbare effecten als de bovenstaande (endogene) stoffen kunnen vertonen. Het gaat hierbij om directe sympathomimetische effecten, zoals nabootsing van catecholamines die de adrenerge receptoren activeren. Daarnaast gaat het om indirecte sympathomimetische effecten, zoals nabootsing van de trace amines die via TAAR1 de heropname en afgifte van de catecholamines kunnen beïnvloeden. Stoffen die tot nu toe tot deze selectie behoren zijn stoffen uit de klassen van fenethylamines en de alkylamines (zie Tabel 1).

Tabel 1 – Selectie van trace amine- en catecholamine-achtige stoffen gedetecteerd in voedingssupplementen

Stof gedetecteerd in voedingssupplement	Stofklasse	Referenties
1,3-Dimethylamylamine (DMAA)	alkylamine	1,3,16-21
1,3-Dimethylbutylamine (DMBA)	alkylamine	1,3,17,18,21
2-Amino-6-methylheptane (DMHA)	alkylamine	3,17
Dimethylaminoethanol (DMAE)	alkylamine	1,18
β -Methylfenethylamine (BMPEA)	fenethylamine	1,3,18,21-23

Halostachine	fenethylamine	1
Higenamine	fenethylamine	1,3,18,21,24
Hordenine	fenethylamine	1,18,22,25
Isopropyl-norsyefrine	fenethylamine	1,3,4,20,22,26
Methylsyefrine	fenethylamine	1,3,4,18,21,22,26,27
N,N-Dimethylfenethylamine (N,N-DMPEA)	fenethylamine	18
N-methyltyramine	fenethylamine	18,22,26
Octopamine	fenethylamine	1,22,26
Fenethylamine (PEA)	fenethylamine	1,18,22,23,28
Syefrine	fenethylamine	1,4,18-20,22,26,27,29
Tyramine	fenethylamine	26

In vivo en ex vivo studies

Op basis van de uitgevoerde *in vitro* studies, zullen vervolgens de meest potente en effectieve stoffen worden geselecteerd om verder te onderzoeken in *in vivo* en *ex vivo* studies. Dit wordt bepaald door te kijken naar de concentratie van de stoffen waarbij een effect van 50% van het maximale effect behaald wordt (EC₅₀ waarde). Daarnaast wordt er gekeken naar het maximale effect dat een stof kan geven ten opzichte van het maximale effect van een positieve controle, zoals adrenaline. Dit is de E_{max} waarde. Teststoffen met een *in vitro* EC₅₀ kleiner dan 10 µM en een E_{max} waarde groter dan 70% worden geselecteerd om te onderzoeken in een *in vivo* en twee *ex vivo* diersystemen. Deze modellen worden gebruikt met als doel om de translatie van fundamentele werkingsmechanismen naar fysiologisch relevante functionele effecten te maken. De *in vivo* en *ex vivo* modellen dienen hier dus als fysiologisch relevantere modellen dan de voorafgaande celmodellen waarmee de effecten van receptoractivatie (α1, α2, β1, β2, TAAR1) op orgaanfunctie bestudeerd worden. De sympathomimetische effecten van de geselecteerde stoffen worden in drie modellen bestudeerd: (1) *in vivo* cardiovasculaire effecten, (2) *ex vivo* effecten op bloedvatvernauwing en/of -verwijding in mesenteriale weerstandsvaten en (3) *ex vivo* centrale effecten op de afgifte en heropname van trace amines in synaptosomen uit de hersenen. De drie modellen worden naast elkaar gebruikt. Er zijn geen selectiemomenten tussen de drie modellen

(1) In vivo: cardiovasculaire effecten

Om de effecten van activatie van adrenerge receptoren en TAAR1 op het cardiovasculaire systeem te bestuderen, worden volwassen Wistar Kyoto (WKY) ratten intraveneus blootgesteld aan de teststoffen (met toenemende dosering). Hierbij wordt gebruik gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke ratten, om zo de gebruikersgroep van deze voedingssupplementen in de samenleving het best te weerspiegelen³⁰. Met draadloze telemetrie-zenders worden cardiovasculaire effecten, zoals bloeddruk, hartslagfrequentie en inotropie waargenomen. Dieren zullen aan maximaal 5 stoffen worden blootgesteld met een wash-out periode na iedere stof. Er wordt ernaar gestreefd om dieren zoveel als mogelijk her te gebruiken (met een maximum van 5 teststoffen per dier). Tussen de toediening van de toenemende concentraties (inclusief vehicle) van een stof vindt geen wash-out plaats. Hoewel de klaringssnelheid van de meeste stoffen onbekend is, is er voor de bepaling van de wash-outperiode gekeken naar gegevens van de vergelijkbare stof methamfetamine. De halfwaardetijd van methamfetamine is ongeveer 70 minuten in ratten na iv-toediening³¹. Deze stof zal na ongeveer 280 minuten helemaal geklaard zijn (70 maal omrekeningsfactor 4 = 280 minuten). Om er zeker van te zijn dat metabolieten ook geklaard zijn en om de dieren ruim tijd te geven om te herstellen van mogelijke effecten, is er gekozen voor een ruime wash-out periode van minimaal 1 week. Ook vanuit praktisch oogpunt geeft dit de onderzoekers voldoende tijd om alle studies goed te kunnen uitvoeren en voor te bereiden.

Na de laatste wash-out periode worden de dieren opgeofferd middels decapitatie. De keuze gaat uit naar deze dodingsmethode, omdat deze methode minimale effecten heeft op het hersenweefsel dat gebruikt wordt voor de latere *ex vivo* studies. Er zal geen anestheticum in de hersenen achterblijven en er zal geen beschadiging optreden aan de hersenstam (in tegenstelling tot een overdosis anesthesie of cervicale dislocatie, respectievelijk)^{32,33}. Dit is van groot belang voor de kwaliteit van de synaptosomen. Daarnaast kunnen andere methoden, zoals een overdosis anesthesie en CO₂ inhalatie, de vaatfunctie beïnvloeden, wat niet wenselijk is voor de latere *ex vivo* vaatstudies³⁴. In de literatuur staat, tot zover bekend, niet beschreven of decapitatie de vasculaire functie beïnvloedt. Echter, de voordelen van deze dodingsmethode voor de kwaliteit van het hersenweefsel zijn groter dan de eventuele nadelige effecten op de vaten. Daarnaast worden alle dieren op dezelfde manier gedood, inclusief de controles, waardoor correctie voor eventuele effecten is ingebouwd in de studie.

(2) Ex vivo: mesenteriale vaten

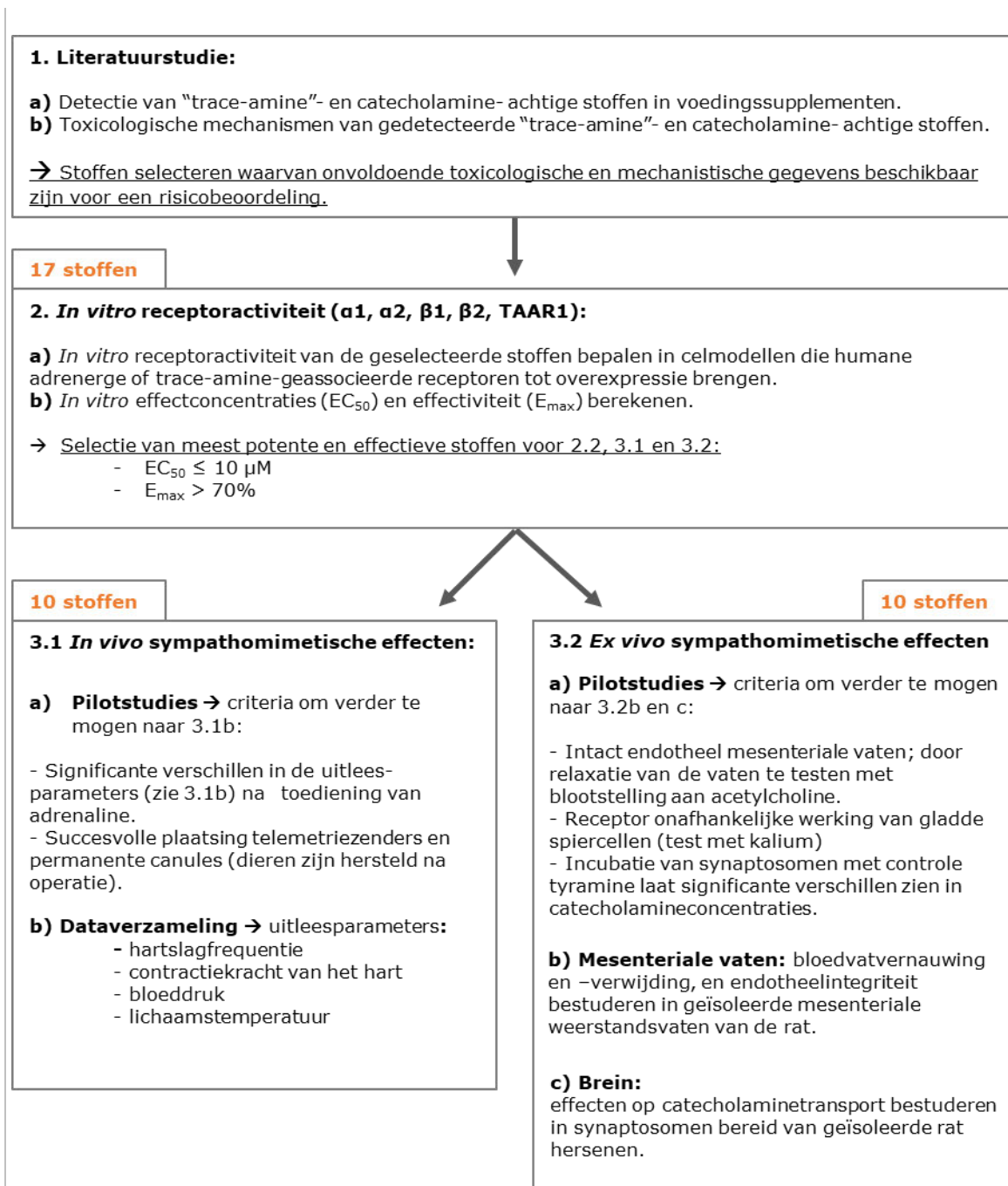
Directe sympathomimetische effecten op de adrenerge receptoren worden verder bestudeerd in mesenteriale weerstandsvaten van de rat. Met dit model kan van eerder vastgestelde *in vivo* α -effecten vastgesteld worden of deze enkel perifeer gereguleerd zijn of ook centraal. Indien *in vivo* α -effecten centraal gereguleerd zijn, zullen deze effecten in dit *ex vivo* model niet zichtbaar zijn. De weerstandsvaten spelen een belangrijke rol bij de bloeddrukregulatie. De gladde spiercellen in deze vaten bevatten zowel α 1- als α 2-adrenerge receptoren, die vasoconstrictie reguleren. Meerdere studies laten zien dat dit model geschikt is om zowel α 1- als α 2- adrenerge receptor gemedieerde vasoconstrictie te bestuderen (zoals Wong et al. 2010; Vrolijk et al. 2015; Hao et al. 2006; Kapsokalyvas et al. 2014³⁵⁻³⁸). Naast vasoconstrictie worden effecten van de geselecteerde stoffen op vaatdilatatie bestudeerd door effecten te vergelijken met goed bestudeerde specifieke β 2 agonisten, zoals salbutamol³⁹. Om receptor gemedieerde effecten te bevestigen zullen effecten van teststoffen ook in combinatie met selectieve antagonisten onderzocht worden. De effecten van de geselecteerde stoffen op vasculaire tonus (contractie en dilatatie), endotheel- en gladde spiercelintegriteit van de geïsoleerde mesenteriale weerstandsvaten worden onderzocht met een *small vessel* myograaf, waarbij resultaten worden vergeleken met goed bestudeerde stoffen zoals adrenaline en efedrine⁴⁰. Hierbij zullen concentratie-response relaties (EC₅₀) en maximale effecten (E_{max}) bepaald worden.

(3) Ex vivo: brein

Indirecte sympathomimetische effecten van de geselecteerde stoffen worden bestudeerd in synaptosomale incubaties. Na opoffering van de rat worden delen van de hersenen geïsoleerd voor de bereiding van een homogenaat, waarmee de effecten van de geselecteerde stoffen op TAAR1-gemedieerd dopamine-, noradrenaline- en serotoninetransport bestudeerd kunnen worden. Schindler et al. (2021) laten zien dat voor dopamine transport assays hersenweefsel uit de Nucleus caudatus gebruikt kan worden en voor noradrenaline en serotonine transport het gehele brein zonder het cerebellum en caudaat weefsel⁴¹. In de assays zullen de effecten van de teststoffen bestudeerd worden op de fosforylatie van dopamine-, noradrenaline- en serotoninetransporters (met behulp van Westernblot). Ook worden de effecten van de teststoffen op (her)opname van dopamine, noradrenaline en serotonine via bovengenoemde transporters bestudeerd door release van deze endogene stoffen met massaspectrometrie te kwantificeren.

Pilotstudies

Voordat er overgegaan kan worden op dataverzameling van de *in vivo* (3.1) en *ex vivo* (3.2) studies is het van belang eerst pilotstudies uit te voeren. Deze pilotstudies zijn nodig om de onderzoekers op te leiden voor een aantal experimentele handelingen: (1) het plaatsen van de telemetrieapparatuur in de dieren, (2) het aanbrengen van permanente canules, (3) isolaties van mesenteriale vaten en hersenweefsel, (4) het plaatsen van mesenteriale vaten in een functionerende myograafopstelling en (5) optimalisatie van het bereidingsprotocol voor synaptosomen.



Figuur 2 – Samenvatting en schematische weergave van de projectfasering

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Er wordt in deze strategie gestart met een literatuurstudie, om een overzicht van de gedetecteerde farmacologisch actieve stoffen te krijgen. Er is gekozen voor de selectie van de 17 stoffen die verder *in vitro* onderzocht worden, omdat dit stoffen zijn waarvan de NVWA onvoldoende gegevens heeft om een risicobeoordeling uit te voeren en omdat dit potentiële sympathomimetische stoffen zijn vanwege hun vergelijkbare molecuulstructuur met endogene catecholamines en trace amines. Omdat het aantal gevonden (potentieel) actieve stoffen in voedingssupplementen groot is, is het niet haalbaar alle stoffen in de *in vitro* en in de dierstudies te onderzoeken. De opbouw van de strategie zorgt voor een prioritering, waarbij in de literatuurstudie wordt gekeken om een selectie van de meest maatschappelijk relevante stoffen te selecteren. De resultaten van de *in vitro* studies geven een beeld van welke stoffen mogelijk *in vivo/ex vivo* effecten kunnen laten zien. Dit is dus een non-invasieve manier om snel en gericht resultaten te krijgen. De *in vitro* studies zorgen ervoor dat er een prioritering plaatsvindt op basis van potentie en effectiviteit om uiteindelijk *in vivo* en *ex vivo* significante effecten te kunnen waarnemen. Stoffen die *in vitro* geen of minimale effecten laten zien, zullen naar verwachting ook geen significante effecten in de *in vivo/ex vivo* studies laten zien. Deze strategie is dus een zo efficiënt mogelijke aanpak om de NVWA van onderzoeksresultaten te voorzien die nodig zijn voor de handhaving en regulatie van deze stoffen in voedingssupplementen. Ook zorgen de verschillende selectiemomenten ervoor dat dit een goede strategie is om (A) niet onnodig stoffen in dieren te testen en zo het aantal benodigde dieren voor dit project te verminderen en (B) om gericht potentieel gevaarlijke stoffen van de markt te verwijderen.

Er is gekozen voor de rat als *in vivo/ex vivo* model, omdat het cardiovasculair systeem van de rat vergelijkbaar is met dat van de mens⁵⁶. De keuze gaat uit naar intraveneuze blootstelling in de *in vivo* studies om invloed van de biologische beschikbaarheid uit te sluiten⁵⁷. De reden om de dieren intraveneus bloot te stellen is om dosis-respons relaties te onderzoeken om zo de *in vivo* potentie van de teststoffen te bepalen. Dit is niet mogelijk wanneer teststoffen oraal toegediend worden.

Om relevante concentraties toe te dienen in de dierproef wordt gekeken naar gerapporteerde plasmaconcentraties in de mens. Van een aantal stoffen zijn plasmaconcentraties in mensen gemeten na een orale toediening. Voor methylsynefrine is bijvoorbeeld een maximale plasmaconcentratie van 678 nM gemeten na een orale inname van 64 mg⁵⁸. Van de stof DMAA zijn maximale plasmawaarden in een mens gemeten van 668 nM na orale inname van 25 mg⁵⁹. Op basis van deze plasmawaarden kan een concentratierange geselecteerd worden voor de dierstudie, zodat er fysiologisch relevante concentraties getest worden. Dit is echter niet mogelijk voor alle geselecteerde stoffen door een gebrek aan gegevens in de literatuur. Hiervoor zal daarom een schatting op basis van de overeenkomsten in chemische structuur, opnamedata van *in vitro* studies met Caco-2 cellen en de potentiewaarden uit *in vitro* receptor assays gebruikt worden om een range aan doseringen te kiezen.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen

Referenties

1. Biesterbos, J. W. H., Sijm, D. T. H. M., van Dam, R. & Mol, H. G. J. A health risk for consumers: the presence of adulterated food supplements in the Netherlands. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **36**, 1273–1288 (2019).
2. Venhuis, B. J. & de Kaste, D. *Scientific Opinion on the Regulatory Status of 1,3-Dimethylamylamine (DMAA)*. www.sciencedomain.org.
3. Cohen, P. A., Travis, J. C., Vanhee, C., Ohana, D. & Venhuis, B. J. Nine prohibited stimulants found in sports and weight loss supplements: deterenol, phenpromethamine (Vonedrine), oxilofrine, octodrine, beta-methylphenylethylamine (BMPEA), 1,3-dimethylamylamine (1,3-DMAA), 1,4-dimethylamylamine (1,4-DMAA), 1,3-dimethylbutylamine (1,3-DMBA) and higenamine. *Clinical Toxicology* (2021) doi:10.1080/15563650.2021.1894333.
4. Venhuis, B., Keizers, P., van Riel, A. & de Kaste, D. A cocktail of synthetic stimulants found in a dietary supplement associated with serious adverse events. *Drug Testing and Analysis* **6**, 578–581 (2014).
5. Razenberg, L., Notenboom, S. & de Wit-Bos, L. Het gebruik van workout-supplementen door sporters in Nederland. *RIVM-rapport* **0116**, (2021).
6. Zeijlon, R., Hantelius, V., Wallerstedt, S. M. & Holmqvist, L. Sports nutrition supplements and adverse events – a meta-epidemiological study of case reports specifically addressing causality assessment. *European Journal of Clinical Pharmacology* vol. 78 (2022).
7. Katzung, B. G. *Basic & Clinical Pharmacology*. <http://www.usdoj.gov/dea/pubs/scheduling.html>.
8. Pei, Y., Asif-Malik, A. & Canales, J. J. Trace amines and the trace amine-associated receptor 1: Pharmacology, neurochemistry, and clinical implications. *Frontiers in Neuroscience* **10**, 148 (2016).
9. Rutigliano, G., Accorroni, A. & Zucchi, R. The Case for TAAR1 as a Modulator of Central Nervous System Function. *Frontiers in Pharmacology* **8**, (2017).
10. Xie, Z. *et al.* Rhesus monkey trace amine-associated receptor 1 signaling: enhancement by monoamine transporters and attenuation by the D2 autoreceptor in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **321**, 116–127 (2007).
11. Juárez Olguín, H., Calderón Guzmán, D., Hernández García, E. & Barragán Mejía, G. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, (2016).
12. Cyprotex. Caco-2 Permeability Assay. <https://www.cyprotex.com/admepk/in-vitro-permeability-and-drug-transporters/caco-2-permeability/>.
13. Riedel, M. *et al.* Functional and Pharmacological Analysis of Cardiomyocytes Differentiated from Human Peripheral Blood Mononuclear-Derived Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **3**, 131 (2014).
14. Sirenko, O. *et al.* Multiparameter in vitro assessment of compound effects on cardiomyocyte physiology using iPSC cells. *Journal of Biomolecular Screening* **18**, 39–53 (2013).
15. Sharma, A. *et al.* Use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to assess drug cardiotoxicity. *Nature Protocols* **13**, 3018–3041 (2018).
16. Cohen, P. A., Travis, J. C. & Venhuis, B. J. A synthetic stimulant never tested in humans, 1,3-dimethylbutylamine (DMBA), is identified in multiple dietary supplements. *Drug Testing and Analysis* **7**, 83–87 (2015).
17. Cohen, P. A., Travis, J. C., Keizers, P. H. J., Deuster, P. & Venhuis, B. J. Four experimental stimulants found in sports and weight loss supplements: 2-amino-6-methylheptane (octodrine), 1,4-dimethylamylamine (1,4-DMAA), 1,3-dimethylamylamine (1,3-DMAA) and 1,3-dimethylbutylamine (1,3-DMBA). *Clinical Toxicology* **56**, 421–426 (2018).
18. Avula, B. *et al.* Liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometric method for targeted analysis of 111 nitrogen-based compounds in weight loss and ergogenic supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **174**, 305–323 (2019).
19. Hachem, R. *et al.* Proton NMR for detection, identification and quantification of adulterants in 160 herbal food supplements marketed for weight loss. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **124**, 34–47 (2016).

20. Bovee, T. F. H. *et al.* Dietary supplement for energy and reduced appetite containing the β -agonist isopropylotopamine leads to heart problems and hospitalisations. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2016.1167965> **33**, 749–759 (2016).
21. Duiven, E., van Loon, L. J. C., Spruijt, L., Koert, W. & de Hon, O. M. Undeclared doping substances are highly prevalent in commercial sports nutrition supplements. *Journal of Sports Science and Medicine* **20**, 328–338 (2021).
22. Zhao, J., Wang, M., Avula, B. & Khan, I. A. Detection and quantification of phenethylamines in sports dietary supplements by NMR approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **151**, 347–355 (2018).
23. Yun, J., Kwon, K., Choi, J. & Jo, C. H. Monitoring of the amphetamine-like substances in dietary supplements by LC-PDA and LC-MS/MS. *Food Science and Biotechnology* **26**, 1185–1190 (2017).
24. Cohen, P. A., Travis, J. C., Keizers, P. H. J., Boyer, F. E. & Venhuis, B. J. The stimulant higenamine in weight loss and sports supplements. *Clinical Toxicology* **57**, 125–130 (2019).
25. Pawar, R. S., Sagi, S. & Leontyev, D. Analysis of bitter orange dietary supplements for natural and synthetic phenethylamines by LC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis* **12**, 1241–1251 (2020).
26. Pawar, R. S., Sagi, S. & Leontyev, D. Analysis of bitter orange dietary supplements for natural and synthetic phenethylamines by LC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis* **12**, 1241–1251 (2020).
27. Vaysse, J. *et al.* Food Additives and Contaminants Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY 1 H-NMR. (2010) doi:10.1080/19440041003705821.
28. ElSohly, M. A. & Gul, W. LC-MS-MS Analysis of Dietary Supplements for N-ethyl- α -ethyl-phenethylamine (ETH), N, N-diethylphenethylamine and Phenethylamine. *Journal of Analytical Toxicology* **38**, 63–72 (2014).
29. Paíga, P. *et al.* Analysis of pharmaceutical adulterants in plant food supplements by UHPLC-MS/MS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **99**, 219–227 (2017).
30. Berg van den *et al.* 2018_RIVM_gebruik en veiligheid van doping en sportvoedingssupplementen.
31. Milesi-Hallé, A., Hendrickson, H. P., Laurenzana, E. M., Gentry, W. B. & Owens, S. M. Sex- and dose-dependency in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of (+)-methamphetamine and its metabolite (+)-amphetamine in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **209**, 203–213 (2005).
32. Cressey, D. Best way to kill lab animals sought. *Nature* **500**, 130–131 (2013).
33. Hawkins, P. *et al.* A Good Death? Report of the Second Newcastle Meeting on Laboratory Animal Euthanasia. *Animals* 2016, Vol. 6, Page 50 **6**, 50 (2016).
34. Boivin, G. P., Hickman, D. L., Creamer-Hente, M. A., Pritchett-Corning, K. R. & Bratcher, N. A. Review of CO₂ as a Euthanasia Agent for Laboratory Rats and Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **56**, 491 (2017).
35. W Wong, E. S., K Man, R. Y., Vanhoutte, P. M., J Ng, K. F. & Ka Shing, L. Dexmedetomidine Induces Both Relaxations and Contractions, via Different 2-Adrenoceptor Subtypes, in the Isolated Mesenteric Artery and Aorta of the Rat. (2010) doi:10.1124/jpet.110.170688.
36. Vrolijk, M. F. *et al.* The supplement–drug interaction of quercetin with tamsulosin on vasorelaxation. *European Journal of Pharmacology* **746**, 132–137 (2015).
37. Hao, L., Nishimura, T., Wo, H. & Fernandez-Patron, C. Vascular responses to α 1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 819–825 (2006).
38. Kapsokalyvas, D. *et al.* Imaging evidence for endothelin ETA/ETB receptor heterodimers in isolated rat mesenteric resistance arteries. *Life Sciences* **111**, 36–41 (2014).
39. salbutamol (inhalatie). https://www.farmacotherapeutischkompas.nl/bladeren/preparaatteksten/s/salbutamol__inhalatie_.
40. Zhang, M. *et al.* The cardiovascular side effects of Ma Huang due to its use in isolation in the Western world. *European Journal of Integrative Medicine* **18**, 18–22 (2018).
41. Schindler, C. W., Thorndike, E. B., Partilla, J. S., Rice, K. C. & Baumann, M. H. Amphetamine-like neurochemical and cardiovascular effects of α -ethylphenethylamine analogs found in dietary supplements. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **376**, 118–126 (2021).
42. Cohen, P. A., Zeijlon, R., Nardin, R., Keizers, P. H. J. & Venhuis, B. Hemorrhagic Stroke Probably Caused by Exercise Combined With a Sports Supplement Containing β -Methylphenyl-ethylamine (BMPEA): A Case Report. <https://doi.org/10.7326/L15-0106> **162**, 879–880 (2015).
43. Brandon Harris, C. F. Hemorrhagic Stroke in a Young Healthy Male Following Use of Pre-Workout Supplement Animal Rage XL. *MILITARY MEDICINE* **182**, 2030 (2017).

44. Smith, T. B., Staub, B. A., Natarajan, G. M., Lasorda, D. M. & Poornima, I. G. Acute myocardial infarction associated with dietary supplements: Containing 1,3-dimethylamylamine and citrus aurantium. *Texas Heart Institute Journal* **41**, 70–72 (2014).
45. Cianchino, V., Acosta, G., Ortega, C., Martínez, L. D. & Gomez, M. R. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. *Food Chemistry* **108**, 1075–1081 (2008).
46. Date, H. *et al.* [Rapid determination of medical components found in the health food for weight loss by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)]. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **128**, 811–817 (2008).
47. Wang, J., Chen, B. & Yao, S. Food Additives and Contaminants Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS. *Food Additives and Contaminants* **25**, 822–830 (2008).
48. Chen, Y. *et al.* Food Additives and Contaminants Determination of synthetic drugs used to adulterate botanical dietary supplements using QTRAP LC-MS/MS. (2009) doi:10.1080/02652030802641880.
49. Tseng, M.-C., Tsai, M.-J., Lin, J.-H. & Wen, K.-C. *GC/MS Analysis on Anorectics Adulterated in Traditional Chinese Medicines. Pages Journal of Food and Drug Analysis* vol. 8 (2000).
50. M, W., A, J., K, C., E, T.-L. & D, K. Determination of designer doping agent--2-ethylamino-1-phenylbutane--in dietary supplements and excretion study following single oral supplement dose. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **115**, 523–533 (2015).
51. Bogusz, M. J., Hassan, H., Al-Enazi, E., Ibrahim, Z. & Al-Tufail, M. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 554–564 (2006).
52. Wahlstrom, R. & Styles, C. Reliable identification and quantification of three diethylphenethylamines in a Dendrobium-based dietary supplement †. (2014) doi:10.1039/c4ay01452a.
53. van Hunsel, F., Venhuis, B. J., Keizers, P. H. J. & Kant, A. A "natural" weight loss product containing sibutramine. (2015) doi:10.1002/dta.1925.
54. Zou, P., Sze-Yin Oh, S., Kiagn, K.-H., Low, M.-Y. & Bloodworth, B. C. Detection of sibutramine, its two metabolites and one analogue in a herbalproduct for weight loss by liquidchromatography triple quadrupolemass spectrometry and time-of-flightmass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 614–618 (2007).
55. Huang, Z., Xiao, S., Luo, D., Chen, B. & Yao, S. Simultaneous Determination of Sibutramine and N-Di-desmethylsibutramine in Dietary Supplements for Weight Control by HPLC—ESI-MS. *Journal of Chromatographic Science* **46**, 707–711 (2008).
56. Sanada, L. S., Tavares, M. R., Neubern, M. C. M., Salgado, H. C. & Fazan, V. P. S. Can Wistar rats be used as the normotensive controls for nerve morphometry investigations in spontaneously hypertensive rats (SHR)? *Acta Cirúrgica Brasileira* **26**, 514–520 (2011).
57. Cao, X., Gibbs, S.T., Fang, L., Miller, H.A., Landowski, C.P., Shin, H., Lennernas, H., Zhong, Y., Amidon, G.L., Yu, L.X., Sun, D. Why is it Challenging to Predict Intestinal Drug Absorption and Oral Bioavailability in Human Using Rat Model. *Pharmaceutical Research*, Vol. 23, No. 8, p. 1675 – 1686 (2006).
58. Verho, M., Malerczyk, V., Kauert, G., Lorenz, H. Dose linearity and relative bioavailability testing of oxilofrine, a sympathomimatic drug, in healthy volunteers. *International Journal of Pharmacology Research* 211-5, 8(3) (1988).
59. Schilling, B., Hammond, K., Bloomer, R., Presley, C., Yates, C. Physiological and pharmacokinetic effects of oral 1,3-dimethylamylamine administration in men. *BMC pharmacology and toxicology* 52, 14 (2013).

Tabel 2 – Overzicht van farmacologisch actieve stoffen gedetecteerd in voedingssupplementen gericht op bevordering van sportprestaties, gewichtsverlies en libido

Stof	Stofklasse	Referentie
------	------------	------------

bisoprolol	bètablokker	21
dapoxetine	serotonineheropnameremmer	1
evodiamine	alkaloïde	18
fluoxetine	serotonineheropnameremmer	1,19
furosemide	lisdiuretica	45
lorcaserin	benzazepine	1,19
phenibut (aminophenylbutyric acid)	gamma-aminoboterzuur (GABA) analoog	18
phenolphthaleïn	phthaleïn	1,19,27,46-48
pikatripin (N-nicotinoyl-GABA)	gamma-aminoboterzuur (GABA) pre-cursor	18
podophyllotoxin	podofyllotoxinederivaten	1
sennosides A and B	contactlaxantia	46
piperine	alkaloïde	18
1,3-dimethylamylamine (1,3-DMAA)	alkylamine	1,3,16-21
1,3-dimethylbutylamine (1,3-DMBA)	alkylamine	1,3,17,18,21
1,4-dimethylamylamine (1,4-DMAA)	alkylamine	3,17
2-amino-6-methylheptane (octodrine; DMHA)	alkylamine	3,17
dimethylaminoethanol (DMAE; deanol)	alkylamine	1,18
gamma-aminoboterzuur (GABA)	gamma-aminoboterzuur (GABA)	18
fursultiamine	allithiamine (vitamine B1 analoog)	18
aristolochiazuur I	aristolochiazuur	1
aristolochiazuur II	aristolochiazuur	1
diazepam	benzodiazepine	49
vitaberin (berberine)	benzylisoquinoline alkaloïde	27
higenamine	benzyltetrahydroisoquinoline	1,3,18,21,24
tetrahydrocannabinol (THC)	cannabinoïde	1
strychnine	crystalline alkaloïde	1,21
icariïn	flavonol glycoside	1
kavain	kavalactone	1
orlistat	lipstatine	19
noopept (omberacetam)	nootropic	18
2-ethylamino-1-phenylbutane	fenethylamine	50
bèta-methylfenethylamine (BMPEA)	fenethylamine	1,3,18,21-23
bèta-fenethylamine	fenethylamine	1,18,22,23,28
cathine (norpseudoefedrine)	fenethylamine	21
clobenzorex	fenethylamine	49
isopropyloctopamine;	fenethylamine	1,3,4,20,22,26

efedrine	fenethylamine	1,21,45
fenfluramine	fenethylamine	48,51
halostachine	fenethylamine	1
hordenine	fenethylamine	1,18,22,26
methylefedrine	fenethylamine	21
N,alfa-diethyl-fenylethylamine (N,alfa-DEPEA)	fenethylamine	52
N,beta-diethyl-fenylethylamine (N,beta-DEPEA)	fenethylamine	52
N,N-DEPEA	fenethylamine	52
N,N-dimethylfenethylamine (N,N-DMPEA)	fenethylamine	18
N-beta-dimethylfenethylamine (fenpromethamine; vonedrine; N-methyl-beta-methylfenethylamine; N,beta-DMPEA)	fenethylamine	3,21
N-Ethyl- α -ethyl-fenethylamine (ETH)	fenethylamine	28
N-methyl-b β -fenethylamine	fenethylamine	18
N-Methyl-difenethylamine (demelverine)	fenethylamine	18
N-methyltyramine	fenethylamine	18,22,26
norefedrine (fenylpropanolamine)	fenethylamine	45
octopamine	fenethylamine	1,22,26
oxilofrine (methylysynefrine)	fenethylamine	1,3,4,18,21,22,26,27
fentermine	fenethylamine	1,49,51
synephrine	fenethylamine	1,4,18-20,22,26,27,29
tyramine	fenethylamine	26
mucuna (L-DOPA)	fenethylamine (catechol amine)	18
dendrobine	plant alkaloid	18
heliotrine	pyrrolizidine alkaloïde	1
lycopsamine	pyrrolizidine alkaloïde	1
monocrotaline	pyrrolizidine alkaloïde	1
monocrotaline-N-oxide	pyrrolizidine alkaloïde	1
senecionine-NO	pyrrolizidine alkaloïde	1
seneciphylline-NO	pyrrolizidine alkaloïde	1
ajmalicine (δ -yohimbine)	rauwolfia alkaloïde	20
corynanthine/rauwolscine	rauwolfia alkaloïde	20
rauwolscine	rauwolfia alkaloïde	1
rescinamine	rauwolfia alkaloïde	20

reserpine	rauwolfia alkaloïde	20
yohimbine	rauwolfia alkaloïde	1,4,18,20
benzyl-sibutramine	sibutramine	1,53
N-desmethyilsibutramine	sibutramine	54
N-didesmethyilsibutramine	sibutramine	54,55
sibutramine	sibutramine	1,19,27,46– 48,53–55
aminotadalafil	sildenafil	1
sildenafil	sildenafil	1,19
tadalafil	sildenafil	1
thiodimethyl sildenafil	sildenafil	1
thiohomosildenafil	sildenafil	1
thiosildenafil	sildenafil	1
mazindol	sympathomimetische amine	46,49
sulbutiamine	thiamine (vitamine B1 analo0g)	18
hydrochlorothiazide	thiazide	46
bisacodyl	trifenylmethaan	46
scopolamine	tropane alkaloïde	1
5-methoxytryptamine (mexamine)	tryptamine	18
cafeïne	xanthine	1,4,18– 20,27,45,49,51
theacrine	xanthine	18
theobromine	xanthine	18
theofylline	xanthine	4,18



Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
1	Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Pilot studies

In dit onderzoek worden een aantal technieken toegepast waarvan het van groot belang is dat onderzoekers deze goed beheersen. Hiervoor is opleiding en training vereist, wat middels pilotstudies zal worden verworven. Gedurende pilotstudies worden onderzoekers opgeleid voor de volgende technieken: (1) het plaatsen van de telemetrieapparatuur in de dieren, (2) het aanbrengen van permanente canules, (3) isolaties van mesenteriale vaten en hersenweefsel, (4) het plaatsen van mesenteriale vaten in een functionerende myograafopstelling en (5) optimalisatie van het synaptosoom bereidingsprotocol. De vakgroep heeft de kennis in huis om deze onderzoekers op te leiden voor de bovenstaande technieken. De pilotstudie voorafgaande aan de *in vivo* studie is afgerond indien telemetriezenders en permanente canules succesvol zijn geplaatst en de dieren hersteld zijn van deze operatie. Hoe succesvolle plaatsing en succesvol herstel gemeten wordt, zal in samenspraak met de Instantie voor Dierenwelzijn (IvD) afgestemd worden in het werkprotocol. Het andere criterium om verder te mogen naar de *in vivo* studies voor dataverzameling is dat er significante verschillen in de uitleesparameters te zien moeten zijn na toediening van de controlestof adrenaline. De primaire uitleesparameters om sympathomimetische effecten te kunnen bestuderen in de *in vivo* studies zijn: (1)

hartslagfrequentie, (2) contractiekracht van het hart, (3) bloeddruk en (4) lichaamstemperatuur. Er zijn geen secundaire uitleesparameters.

In vivo studies

De *in vivo* studies starten met een operatie om de telemetrie apparatuur in de dieren in te brengen. Na een herstelperiode van minimaal twee weken wordt het dier intraveneus blootgesteld aan de laagste concentratie van een teststof. Voorafgaand hierop zal eerst nog een vehicle controle toegediend worden. Met draadloze telemetriezenders worden effecten op het sympathisch zenuwstelsel gemeten. Dit zijn: bloeddruk, hartslagfrequentie, hartslagcontractiekracht (inotropie) en lichaamstemperatuur. Indien er een effect optreedt en dit effect stabiliseert, dan wordt een volgende, hogere, dosis van de concentratiereeks toegediend. Indien er bij de laagste concentratie geen effect optreedt, zal er overgegaan worden op de volgende dosis in de reeks. Er zullen een aantal dosissen toegediend worden om dosis-response relaties te kunnen vaststellen. Nadat dit voor de eerste teststof gedaan is, vindt er een wash-outperiode plaats. Om er zeker van te zijn dat de teststof en eventuele metabolieten geklaard zijn, en om dieren ruim de tijd te geven om te herstellen is gekozen voor een periode van minimaal één week. Indien de dieren geen bijwerkingen van de teststof ondervinden en hersteld zijn, zal na één week een tweede teststof toegediend worden op dezelfde manier als dit voor de eerste teststof gedaan is. Er wordt ernaar gestreefd om dieren zoveel als mogelijk her te gebruiken (met een maximum van 5 teststoffen per dier, met de wash-outperiodes tussen de verschillende teststoffen). Na de laatste wash-out periode worden de dieren opgeofferd middels decapitatie en wordt overgegaan op de *ex vivo* studies.

Ex vivo studies

Voor de synaptosomale (*in vitro*) incubaties met geïsoleerd hersenweefsel zijn de uitleesparameters: (1) expressie van (gefosforyleerde) transporters en receptoren van catecholamines en trace amines en (2) de effecten van de teststoffen op heropname van catecholamines en trace amines. Gen- en eiwitexpressie van transporters en receptoren zal gemeten worden met moleculaire technieken zoals qPCR en Western blot analyse. Catecholamines en trace amines worden gekwantificeerd met chemisch analytische methodes zoals vloeistofchromatografie-massaspectrometrie. Deze studies zijn van belang om de selectie van teststoffen die agonistische- of antagonistische effecten vertonen in de voorafgaande *in vitro* studies te bestuderen in een fysiologisch relevanter onderzoeksmodel dan de eerder uitgevoerde *in vitro* receptoractivatie studies. De uitleesparameters van deze studies zeggen iets over de indirecte sympathomimetische effecten van de (ongereguleerde) teststoffen aanwezig in voedingssupplementen. In de pilotstudies wordt het protocol voor bereiding van synaptosomen geoptimaliseerd en dient de controlestof tyramine significantie verschillen te laten zien in catecholamineconcentraties.

Uitleesparameters voor de *ex vivo* studies met de mesenteriale weerstandsvaten zijn vasoconstrictie en vasodilatatie, welke met een *small vessel* myograaf gemeten gaan worden. Deze uitleesparameters zijn van belang om de effecten van eerder *in vitro* aangetoonde adrenoreceptoragonisten en -antagonisten op orgaanfunctie te bestuderen. Voordat de teststoffen in dit model bestudeerd worden, worden er pilot/controlestudies uitgevoerd. Criteria om de teststoffen in het model te testen zijn: (1) intact endotheel (relaxatietest met acetylcholine) en (2) receptoronafhankelijke werking van de vasculaire gladde spiercellen (depolarisatietest met kalium).

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

Na afronding van de pilotstudies wordt er overgegaan op de *in vivo* studies waarbij de dieren blootgesteld zullen worden aan de teststoffen. Telemetriezenders en permanente canules worden in de dieren geplaatst. Deze operatie gebeurt onder narcose. Om de pijn centraal te verdoven, wordt een opiaat toegediend. Daarnaast wordt een NSAID toegediend tegen perifere pijn en ontstekingen. Na deze operatie hebben de dieren minimaal twee weken nodig om te herstellen. Om er zeker van te zijn dat de hersteltijd lang genoeg is, is er gekozen voor een hersteltijd van twee weken. Na de herstelperiode worden de wakkere dieren (om TAAR1-gemedieerde effecten niet uit te sluiten) aan de eerste teststof blootgesteld (intraveneus). Er wordt gestart met toediening van een vehicle controle. Hierna wordt de laagste concentratie van de eerste teststof toegediend. Na stabilisatie van eventuele effecten wordt een volgende, iets hogere, concentratie toegediend. Dit wordt weer gevolgd door een periode voor het stabiliseren van de effecten en een volgende hogere

concentratie. Op deze manier kan er een dosis-response relatie verkregen worden van de teststof (maximaal 8 concentraties). Naar verwachting zal stabilisatie van effecten binnen enkele minuten tot een uur optreden. Na toediening van de hoogste concentratie en meting van de daaropvolgende effecten, gaat er een wash-outperiode van één week van start. In het project zullen er in de *in vivo* studies maximaal 10 teststoffen bestudeerd worden. Ieder dier zal aan maximaal vijf teststoffen blootgesteld worden (met daartussen de wash-periode van één week).

Hoewel de klaringssnelheid van de meeste stoffen onbekend is, is er voor de bepaling van de wash-outperiode gekeken naar gegevens van de vergelijkbare stof methamfetamine. De halfwaardetijd van methamfetamine is ongeveer 70 minuten in ratten na iv-toediening ¹. Deze stof zal na ongeveer 280 minuten helemaal geklaard zijn (70 maal omrekeningsfactor 4 = 280 minuten). Om er zeker van te zijn dat metabolieten ook geklaard zijn en om de dieren ruim tijd te geven om te herstellen van mogelijke effecten, is er gekozen voor een ruime wash-out periode van één week. Ook vanuit praktisch oogpunt geeft dit de onderzoekers voldoende tijd om alle studies goed te kunnen uitvoeren en voor te bereiden.

Na toediening van de laatste teststof gaat de laatste wash-outperiode van één week van start. Hierna zullen de dieren opgeofferd worden middels decapitatie, waarna hersenweefsel geïsoleerd wordt voor bereiding van de synaptosomen en de darmen met het mesenterium uit het dier gehaald worden voor isolatie van de mesenteriale vaten. Er zullen maximaal tien stoffen getest worden in de twee *ex vivo* modellen.

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

Om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken worden de dieren na blootstelling aan een teststof en na de wash-outperiode hergebruikt voor de bestudering van andere teststoffen. In totaal worden er 5 teststoffen in een dier bestudeerd. Ook wordt het aantal benodigde dieren beperkt door de prioritering gevolgd op de literatuur- en *in vitro* studies.

Het minimaal aantal benodigde dieren wordt bepaald met een powerberekening (alfa = 0.05 en power = 0.8) voor de vier uitleesparameters van de *in vivo* studies (hartslagfrequentie, contractiekracht van het hart, bloeddruk en lichaamstemperatuur). Deze aantallen zijn ook genoeg voor de *ex vivo* studies aangezien er meerdere mesenteriale vaten uit één dier geïsoleerd worden en er meerdere aliquots synaptosomen van het brein van één dier gemaakt kunnen worden. Ook zal een drop-outberekening toegepast worden om rekening te houden met eventueel uitval van dieren. Wanneer de i.v. canule waardoor de teststoffen worden toegediend langer dan 5 weken wordt gebruikt, neemt het risico op uitval toe ^{2,3}. Op basis van de ervaring die **5.1 lid2h** heeft met het uitvoeren van studies met i.v. canules wordt een uitval van ongeveer 20% van de dieren verwacht.

Rekening houdend met bovenstaande zijn naar schatting maximaal 60 dieren nodig voor dit project. Hoe dit aantal tot stand is gekomen, wordt in het werkprotocol in detail beschreven in samenspraak met de IVD.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Rat	Dieren gefokt voor onderzoek (Charles River)	Volwassen (12 weken)	100	mannelijk en vrouwelijk	nee	Wistar Kyoto

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort

	Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en succesvoller geïsoleerd kunnen. Doordat de isolaties sneller plaats kunnen vinden dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere vaten te isoleren uit het mesenterium van de rat. Dit zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren en ook voor verfijning van de dierproeven doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden. Het gebruik van lagere diersoorten, zoals de zebrafish, is hier uitgesloten vanwege de uitleesparameters die in deze studie bestudeerd zullen worden. Het is niet mogelijk de uitleesparameters in deze lagere diersoorten te kwantificeren.
Herkomst	Er is gekozen voor dieren gefokt voor onderzoekdoeleinden door erkende fokkers, om de uitleesparameters in een uniforme groep dieren te kunnen bestuderen.
Levensstadia	De keuze gaat uit naar volwassen dieren om zo de gebruikersgroep van voedingssupplementen in de samenleving na te bootsen ⁴ .
Aantal	Het aantal dieren is gebaseerd op de powercalculatie en de drop-outberekening die in het werkprotocol beschreven worden. Er zijn maximaal 80 ratten nodig om alle teststoffen (max. 10) 8 keer (n=8) in een dier te testen. Voor dit aantal wordt er uitgegaan van het worst case scenario waarbij er slechts één stof in één dier getest kan worden. Het streven is echter om maximaal 5 stoffen in een dier te testen, indien er geen bijwerkingen van de behandelingen optreden, waardoor de verwachting is dat niet alle dieren nodig zullen zijn. Daarnaast zijn er maximaal 20 ratten nodig voor de pilotstudies. Dit is geschat op basis van de ervaring die 5.1 lid2h heeft met dit soort studies en het inwerken van de onderzoekers op de benodigde technieken.
Geslacht	N.v.t. – De keuze gaat uit naar ratten van zowel het mannelijke als het vrouwelijke geslacht om zo de gebruikersgroep van de voedingssupplementen in de samenleving na te bootsen. Er zijn echter wel verschillen in cardiovasculaire regulatie door het sympathisch zenuwstelsel ⁵ , daarom zijn er in deze studie extra dieren nodig om interferentie van effecten van geslachtsverschillen uit te sluiten.
Genetisch gewijzigd	N.v.t.
Stam	Er is gekozen voor Wistar Kyoto ratten, omdat zij een normale bloeddruk hebben en veelvuldig gebruikt worden als controlemodel voor onderzoek naar het cardiovasculaire systeem ⁶⁻⁸ . Referenties De referenties zijn beschreven op de laatste bladzijde van dit document.

C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

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

D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voor het inbrengen van de telemetrieapparatuur en de canule wordt een opiaat gegeven om de pijn centraal te verdoven. Er wordt een NSAID gegeven als perifere pijnstillers en ontstekingsremmers.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De dieren kunnen eventueel stress ervaren. Het welzijn kan mogelijk ook aangetast worden door een infectie via de canule. Daarnaast kunnen de teststoffen het welzijn eventueel tijdelijk aantasten, bijvoorbeeld door verhoogde hartslag, bloeddruk of door stemmingsverandering.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De dieren kunnen mogelijk stress ervaren wanneer zij uit hun kooi worden gehaald en overgeplaatst worden naar de plaats voor de levensbeëindiging. Een andere stressfactor kan de i.v. toediening van de teststoffen zijn. Daarnaast is het doel van dit onderzoek om de sympathomimetische effecten van een aantal teststoffen te bestuderen. Dieren kunnen dus eventueel ook ongemak ervaren doordat het sympathisch zenuwstelsel is geactiveerd met gevolgen zoals een onrustig gevoel, verhoogde hartslag, verhoogde bloeddruk.

Een infectie kan eventueel ontstaan als gevolg van het plaatsen van de telemetrieapparatuur en de canule, of bij toediening van de teststoffen via de canule.

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

De dieren worden gehanteerd door ervaren werknemers, die door hun ervaring in het omgaan met proefdieren weten hoe eventuele stress zoveel als mogelijk vermeden wordt. Dieren worden getraind om te wennen aan de experimentele handelingen.

Om mogelijke infecties te voorkomen zal er aseptische gewerkt worden en wordt er een "vascular access port button" op de vascular access port geplaatst. Indien er bijwerkingen van de te testen stoffen worden vastgesteld met uitgesproken cardiovasculaire effecten zoals bv ritmestoornissen of hypo- of hypertensie die niet transient of corrigeerbaar zijn wordt het experiment voor het dier beëindigd.

E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Er zijn 2 fases in het project waarbij de humane eindpunten verschillend worden gehanteerd:
1 . In de post-operatieve periode:

Humane eindpunten worden gehanteerd indien er complicaties optreden na de operatie met afwijkingen van verwacht herstel.

Deze worden gebaseerd op:

- Gewichtsverlies: In de eerste dagen na de operatie kan er gewichtsverlies optreden als gevolg van de operatie en de toegediende opiaten. Dit gewichtsverlies is tijdelijk van aard. Na enkele dagen herstelt het gewichtsverlies. Er wordt bij beoordeling van gewichtsverlies rekening gehouden met het gewicht van het implantaat. Indien het gewichtsverlies niet herstelt na enkele dagen zoals verwacht wordt (progressief gewichtsverlies) of er meer dan 15% gewichtsverlies optreedt, wordt het dier uit experiment gehaald.
- Klinische symptomen: de eerste dagen na de operatie kunnen dieren zich ziek voelen of buikpijn hebben. Dit kan leiden tot verminderde activiteit, porfyrie, minder verzorgde vacht, verminderde eetlust en tekenen van buikpijn (back-arch, twist, wincing, whrite, gelaatsuitdrukking indicatief voor pijn). De dieren krijgen pijnstilling en post-operatieve zorg. Humane eindpunten worden toegepast indien er
 - o obstipatie optreedt tgv ileus,
 - o dieren geen progressief herstel van de operatie vertonen
 - o abdominale hernia wordt vastgesteld
 - o Geen verbetering van pijnsymptomen optreden ondanks pijnstilling
 - o er een indicatie is voor sepsis
 - o een infectie optreedt ten gevolge van de canule en/of telemetrieoperatie die niet behandelbaar is.
 - o tekenen van inwendige bloeding in de post-operatieve periode
- Technische eindpunten: niet functioneren van de telemetriezender of verstopte canule.

2. in de testperiode:

Na herstel van de operatie worden er humane eindpunten gehanteerd. Deze worden gebaseerd op:

- Het optreden van bijwerkingen ten gevolge van de testsubstanties: Ten gevolge van het toedienen van de teststoffen kunnen er tijdelijke veranderingen optreden in cardiovasculaire parameters en tijdelijke veranderingen in gedrag. Indien deze niet van voorbijgaande aard zijn of niet corrigeerbaar wordt het dier uit experiment genomen. Humane eindpunten zijn gebaseerd op telemetrie data in combinatie met klinische symptomen gebaseerd op onder andere bewustzijn, activiteit, houding, gedrag, interactie met kooigenoten, lichaamsconditie, gang en gewicht. Bij gewichtsverlies van meer dan 15% of klinische symptomen die indicatief zijn voor matig ongerief wordt een dier uit experiment gehaald. Er wordt een welzijnscorelijst opgesteld en afgestemd met de IvD.
- Technische eindpunten: niet functioneren van de telemetriezender of verstopte canule.

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

- Kans op complicaties na operatie: <5%
 - Kans op complicaties ten gevolge van cardiovasculaire bijwerkingen van de testsubstantie waardoor dier uit experiment genomen wordt: 10%
 - Kans op technische eindpunten (voornamelijk het dichtzitten van de infuuslijn): 5%
- Totaal 20%

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Bij de operatie om de telemetriezenders en de canule in de dieren te plaatsen hoort de classificatie "matig ongerief". De i.v. toediening van de teststoffen zal zorgen voor "mild ongerief" indien er geen bijwerkingen worden vastgesteld. Hergebruik van de dieren om een nieuwe teststof te evalueren is mogelijk indien de voorgaande teststoffen maximaal mild en geen-blijvend ongerief/bijwerkingen veroorzaakt hebben.

Tijdens de pilot worden de volgende procedures uitgevoerd die bijdragen aan ongerief voor de dieren:

- Operatie om telemetriezenders en de canule in de dieren te plaatsen (matig ongerief)
- Doding van de dieren (mild ongerief)

Tijdens het hoofdexperiment worden de volgende procedures uitgevoerd die bijdragen aan ongerief voor de dieren:

- Operatie om telemetriezenders en de canule in de dieren te plaatsen (matig ongerief)
- I.V. toediening van de teststoffen (mild ongerief)
- Doding van de dieren (mild ongerief)

G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	<p>De <i>in vitro</i> screening met cellijnen die de adrenoreceptoren (α_1, α_2, β_1, β_2) en TAAR1 tot overexpressie brengen, zorgen voor vervanging van <i>ex vivo</i> dierproeven met een groot deel van de te onderzoeken teststoffen. Teststoffen die in deze <i>in vitro</i> screening geen effect vertonen worden niet onderzocht in de <i>ex/in vivo</i> dierstudies, omdat de verwachting is dat bij de afwezigheid van <i>in vitro</i> effecten er ook geen <i>ex vivo</i> effecten gemeten gaan worden. Ook stoffen met milde <i>in vitro</i> effecten ($EC_{50} > 10 \mu M$ en $E_{max} < 70\%$) worden niet verder bestudeerd in de dierstudies.</p> <p>Momenteel is het nog niet mogelijk om sympathomimetische effecten van deze stoffen in mensen te onderzoeken. Om een duidelijk beeld te krijgen van het verloop van eventuele effecten worden hartslagfrequentie, hartcontractiekracht en bloeddruk continu gemonitord (telemetrie). Continue meting van bloeddruk is in mensen alleen mogelijk door de inbreng van een arteriële canule¹³. Het inbrengen van een arteriële canule is een te invasieve procedure voor humane studies. Daarom is nog niet mogelijk deze dierstudie te vervangen door een humane <i>in vivo</i> studie.</p>
Vermindering	<p>De <i>in vitro</i> receptoractivatie studies zorgen ook voor vermindering in het aantal benodigde dieren voor de <i>in vivo</i> en <i>ex vivo</i> dierproeven. Stoffen die <i>in vitro</i> geen effecten vertonen worden niet meegenomen in de <i>in/ex vivo</i> dierstudies, waardoor het aantal benodigde dieren afneemt. Door het gebruik van wash-outperiodes in de <i>in vivo</i> studie kunnen er meerdere stoffen in één dier worden bestudeerd, wat ook zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren.</p> <p>Daarnaast zullen er zoveel als mogelijk mesenteriale vaten uit één dier geïsoleerd worden, waardoor er meerdere teststoffen tegelijkertijd bestudeerd kunnen worden en er uiteindelijk minder dieren nodig zijn om effecten van alle stoffen te bestuderen.</p> <p>Ook geeft de powerberekening aan wat het minimaal aantal benodigde dieren is om effecten te kunnen waarnemen.</p>
Verfijning	<p>Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals</p>

de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en succesvoller geïsoleerd kunnen. Doordat de isolaties sneller plaats kunnen vinden dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere vaten te isoleren uit het mesenterium van de rat. Dit zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren en ook voor verfijning van de dierproeven doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden.

Daarnaast zijn de proeven verfijnd door meerdere organen/weefsels uit één dier te isoleren. De proeven met de mesenteriale vaten horen met vers geïsoleerde organen uitgevoerd te worden ^{7,9}.

Ook zorgt de geselecteerde dodingsmethode voor een verfijning van de proef, omdat dit een snelle dodingsmethode is, die voor zo min mogelijk ongerief voor het dier zorgt.

De ingebouwde telemetrie-zenders kunnen bloeddruk, hartslagfrequentie, hartcontractiekracht en lichaamstemperatuur continu meten. Dit zorgt ook voor verfijning van de proef, omdat er gemonitord kan worden of deze parameters bij de dieren op gezonde niveaus zijn (buiten de experimenten met toediening van mogelijk sympathomimetische stoffen om). Ook verfijnen de telemetrie-zenders de dierproef, doordat er geen extra handelingen met de dieren uitgevoerd hoeven te worden tijdens de blootstellingen aan de teststoffen. De dieren worden op die momenten met rust gelaten.

Daarnaast worden zowel de dieren als de uitvoerders getraind voor het flushen van de canule, waardoor de proef ook verfijnd wordt. Hierdoor wordt de kans kleiner dat canules verstopt raken en dieren hier eventueel ongemak van ondervinden.

Referenties

De referenties zijn beschreven op de laatste bladzijde van dit document

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

I. Herhaling

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

n.v.t.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

De dieren worden gedood om de organen te isoleren die nodig zijn voor de *ex vivo* studies voor de beantwoording van de hoofd- en subvragen.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

De dieren worden gedood middels decapitatie. De keuze gaat uit naar deze dodingsmethode, omdat deze methode minimale effecten heeft op het hersenweefsel dat gebruikt wordt voor de latere *ex vivo* studies. Er zal geen anestheticum in de hersenen achterblijven en er zal geen beschadiging optreden aan de hersenstam (in tegenstelling tot een overdosis anesthesie of cervicale dislocatie, respectievelijk) ^{10,11}. Daarnaast kunnen andere methoden, zoals een overdosis anesthesie en CO₂ inhalatie, de vaatfunctie beïnvloeden, wat niet wenselijk is voor de latere *ex vivo* vaatstudies ¹². In de literatuur staat, tot zover bekend, niet beschreven of decapitatie de vasculaire functie beïnvloedt. Echter, de voordelen van deze dodingsmethode voor de kwaliteit van het hersenweefsel zijn groter dan de eventuele nadelige (onbekende) effecten op de vaten. Daarnaast worden alle dieren op dezelfde manier gedood, inclusief de controles, waardoor correctie voor eventuele effecten is ingebouwd in de studie.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

n.v.t.

Referenties

1. Milesi-Hallé, A., Hendrickson, H. P., Laurenzana, E. M., Gentry, W. B. & Owens, S. M. Sex- and dose-dependency in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of (+)-methamphetamine and its metabolite (+)-amphetamine in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **209**, 203–213 (2005).
2. Koeslag, D., St, A., Russell, J. C., Humphreys, A. S. & Russell A, J. C. *A technique for long-term venous cannulation in rats.* (1984).

3. de Jong, W. H., Timmerman, A. & van Raaij, M. T. M. Long-term cannulation of the vena cava of rats for blood sampling: local and systemic effects observed by histopathology after six weeks of cannulation.
4. Razenberg, L., Notenboom, S. & de Wit-Bos, L. Het gebruik van workout-supplementen door sporters in Nederland. *RIVM-rapport 0116*, (2021).
5. Evans, J. M. *et al.* Gender differences in autonomic cardiovascular regulation: spectral, hormonal, and hemodynamic indexes. *J Appl Physiol* **91**, 2611–2618 (2001).
6. Kapsokalyvas, D. *et al.* Imaging evidence for endothelin ETA/ETB receptor heterodimers in isolated rat mesenteric resistance arteries. *Life Sciences* **111**, 36–41 (2014).
7. Vrolijk, M. F. *et al.* The supplement–drug interaction of quercetin with tamsulosin on vasorelaxation. *European Journal of Pharmacology* **746**, 132–137 (2015).
8. Sanada, L. S., Tavares, M. R., Neubern, M. C. M., Salgado, H. C. & Fazan, V. P. S. Can Wistar rats be used as the normotensive controls for nerve morphometry investigations in spontaneously hypertensive rats (SHR)? *Acta Cirúrgica Brasileira* **26**, 514–520 (2011).
9. Watanabe, M. & Okada, T. Langendorff perfusion method as an ex vivo model to evaluate heart function in rats. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1816 107–116 (Humana Press Inc., 2018).
10. Cressey, D. Best way to kill lab animals sought. *Nature* **500**, 130–131 (2013).
11. Hawkins, P. *et al.* A Good Death? Report of the Second Newcastle Meeting on Laboratory Animal Euthanasia. *Animals 2016, Vol. 6, Page 50* **6**, 50 (2016).
12. Boivin, G. P., Hickman, D. L., Creamer-Hente, M. A., Pritchett-Corning, K. R. & Bratcher, N. A. Review of CO₂ as a Euthanasia Agent for Laboratory Rats and Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **56**, 491 (2017).
13. Saugel, B., Kouz, K., Meidert, A., Schulte-Uentrop, L., Romagnoli, S. How to measure blood pressure using an arterial catheter: A systematic 5-step approach. *Critical Care* **24**:172 (2020).

Naam van het project	Effecten van actieve stoffen in voedingssupplementen die werking van het sympathisch zenuwstelsel kunnen nabootsen.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-691530 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	36
Trefwoorden	voedingssupplementen farmcologisch actieve stoffen veiligheid; risicobeoordeling sympathisch zenuwstelsel hart- en vaatstelsel
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Cardiovasculair, bloed- en lymfestelsel Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Niet op grond van regelgeving vereist toxicologisch en ecotoxicologisch onderzoek

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Op de Nederlandse markt zijn voedingssupplementen te koop die mensen nemen voor, tijdens of na het sporten. In deze supplementen zijn stoffen gevonden waarvan de veiligheid voor de mens niet onderzocht is. De gevonden stoffen lijken op stoffen die het sympathisch zenuwstelsel kunnen activeren. Activering van dit zenuwstelsel zorgt voor een toename in bloeddruk, hartslagsnelheid en sterkte van de hartslag. Het is echter niet bekend of de gevonden stoffen hiervoor kunnen zorgen. Ook is het niet bekend of deze stoffen giftig kunnen zijn voor de mens. Daarom is het doel van dit onderzoek om te onderzoeken of deze stoffen het sympathisch zenuwstelsel kunnen activeren en of deze stoffen giftig zijn voor de mens. Op deze manier kan er gekeken worden of deze supplementen veilig zijn en of ze eventueel verboden moeten worden.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	Het is van belang voor de maatschappij dat er onderzoek wordt gedaan naar de effecten op het sympathisch zenuwstelsel van deze actieve stoffen in voedingssupplementen. Zo kunnen consumenten beter ingelicht worden over de veiligheid van deze supplementen. Na uitvoering van dit onderzoek kunnen mogelijk gevaarlijke stoffen verboden worden, waardoor ernstige gezondheidsschade (bijv. hartaanval, hersenbloeding, sterfte) voorkomen kan worden. Ook wordt de wetenschap met de uitkomsten van dit project vooruit geholpen. Dit project zal bijdragen aan de kennisontwikkeling van de werking van de te onderzoeken stoffen en stoffen die hierop lijken.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De dieren zullen 1 operatie (onder narcose) ondergaan (max. 2 uur) voor de plaatsing van de draadloze zenders. Zij zullen in totaal maximaal 5 keer op verschillende dagen worden blootgesteld aan een teststof via een infuus (max. 1 uur). De dieren worden gedood door onthoofding. Na overlijden worden bloedvaten en hersenen uit het lichaam gehaald. Deze organen worden gebruikt om verder te onderzoeken buiten het lichaam.</p>					
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Na de operatie kunnen de dieren matige pijn en/of stress ervaren. Zij zullen minimaal twee weken nodig hebben om te herstellen. De toediening van de teststoffen via het infuus kan ook voor stress zorgen en kan de bloeddruk, ademhaling en hartslag van de dieren veranderen. Dit zal van korte duur zijn (max. 1 uur).</p>					
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>			
			<p>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</p>
<p>Ratten (Rattus norvegicus)</p>	<p>100</p>	<p>0</p>	<p>0</p>	<p>100</p>	<p>0</p>	<p>0</p>
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>				
		<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Geadopteerd</p>		
<p>Ratten (Rattus norvegicus)</p>		<p>100</p>	<p>0</p>	<p>0</p>		
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Na de dodingsprocedure kunnen de effecten van actieve stoffen in voedingssupplementen op bloedvatvernauwing en -verwijding en hersencelfunctie bestudeerd worden buiten het lichaam van de dieren. Het gebruik van deze methodes buiten het lichaam van het dier zorgen ervoor dat de dieren geen nadelige bijwerkingen zullen ondervinden.</p>					

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Alternatieve methoden om effecten op hartslag (snelheid en kracht) te bestuderen zijn studies met hartspiercellen. Dit model wordt in dit project gebruikt en zal voorafgaande aan de dierproeven dienen als een pre-screening. Stoffen die geen effecten laten zien in dit celmodel, worden niet uitgebreider bestudeerd in de dieren. Hiermee dient het celmodel met de hartspiercellen voor de stoffen die geen effecten vertonen als vervanging van de dierproef. Ook wordt er gebruik gemaakt van celmodellen die de receptoren tot overexpressie brengen die betrokken zijn bij de regulatie van vaatvernauwing, vaatverwijding, hartslagsnelheid en –kracht. Ook hier geldt dat voor de stoffen die in deze celmodellen geen effecten vertonen, ze de dierproeven vervangen, omdat deze stoffen niet verder bestudeerd worden in de proefdiermodellen. Vervangen van de dierproef in zijn geheel is niet mogelijk, omdat het sympathisch zenuwstelsel uit meerdere organen bestaat. De interactie tussen de verschillende organen is niet na te bootsen buiten het lichaam. Het onderzoek kan niet in mensen uitgevoerd worden, omdat voor het uitlezen van de resultaten voor bloeddruk en hartslag (snelheid en kracht) continu gemeten wordt. Hiervoor dient apparatuur middels een operatie in een bloedvat in de mens ingebracht te worden. Dit is een te ingrijpende procedure voor een wetenschappelijk onderzoek in mensen. Ook is het niet mogelijk dit onderzoek in lagere diersoorten, zoals de zebravis, uit te voeren. De methoden om bloeddruk en hartslag in deze dieren te meten zijn ingewikkelder dan in zoogdieren. Daarnaast zijn de verschillen van de receptoren in het sympathisch zenuwstelsel tussen mens en vis groter dan tussen mens en rat, waardoor de resultaten van de rat beter vertaald kunnen worden naar de mens.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Om zo min mogelijk dieren te gebruiken wordt het aantal benodigde dieren in dit project bepaald met behulp van een statistische berekening.

De eerdergenoemde screening van de stoffen in de celmodellen zorgt ook voor vermindering in het aantal benodigde dieren voor de dierproeven. Stoffen die in de cellen geen effecten vertonen, worden niet meegenomen in de dierstudies, waardoor het aantal benodigde dieren afneemt. Er zullen meerdere teststoffen in 1 dier bestudeerd worden, om zo het aantal benodigde dieren te verminderen. Daarnaast zullen er zoveel als mogelijk bloedvaten uit één dier gehaald worden, waardoor er meerdere teststoffen tegelijkertijd bestudeerd kunnen worden en er uiteindelijk minder dieren nodig zijn om effecten van alle stoffen te bestuderen.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project

Het ongerief wordt geminimaliseerd door dieren voorafgaande aan de operatie pijnstillingsmedicatie toe te dienen en een ruime herstelperiode in te laten. Ook na de operatie zullen zij pijnstillende medicatie krijgen. De ingebrachte meetapparatuur voor de continue meting van bloeddruk, hartslag (snelheid en kracht) en lichaamstemperatuur zorgt ook voor verfijning van de proef, omdat er gemonitord kan worden of deze parameters bij de dieren op gezonde niveaus zijn (buiten de experimenten met toediening van mogelijk sympathomimetische stoffen om). Ook verfijnt deze ingebrachte meetapparatuur de dierproef, omdat er zo geen extra handelingen met de dieren uitgevoerd hoeven te worden tijdens de blootstellingen aan de teststoffen. De dieren worden op die momenten met rust gelaten.

nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.	
Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe	<p>Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en succesvoller geïsoleerd kunnen worden. Doordat de isolaties sneller plaats kunnen vinden dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere bloedvaten te isoleren uit de rat. Dit zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden.</p> <p>Er is gekozen voor ratten, omdat zij een normale bloeddruk hebben en veelvuldig gebruikt worden als controlemodel voor onderzoek naar het hart- en vaatstelsel. De keuze gaat uit naar volwassen dieren om zo de gebruikersgroep van de voedingssupplementen gericht op sportprestaties in de samenleving na te bootsen.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 17 augustus 2022 12:28
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216336
Bijlagen: PV2022_007_5.1 lid2e _NTS_lvd.xlsx; PV2022_007_5.1 lid2e _Aanvraag_lvd.docx.pdf; PV2022_007_5.1 lid2e _Projectvoorstel_lvd.docx.pdf; PV2022_007_5.1 lid2e _Appendix1_lvd.docx.pdf

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202216336.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 17-08-2022, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviesterminen vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 17-08-2022 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

5.1 lid2h Advies PV2022-007 AVD 5.1 lid2h 202216336 5.1 lid2e .

Preambule

De 5.1 lid2h verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de 5.1 lid2h via een beveiligde verbinding.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 5.1 lid2h
2. **Titel van het project:** Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen
3. **Titel van de NTS:** Testen van veiligheid van stoffen in voedingssupplementen voor mensen bij ratten
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:** 5.1 lid2h contactpersoon: 5.1 lid2e
5.1 lid2h, emailadres: 5.1 lid2h
6. **Adviestraject (data dd-mm-jjjj):**

<input checked="" type="checkbox"/> ontvangen door DEC	17.08.2022
<input checked="" type="checkbox"/> aanvraag compleet	17.08.2022
<input checked="" type="checkbox"/> in vergadering besproken	25.08.2022
<input type="checkbox"/> anderszins behandeld	
<input checked="" type="checkbox"/> termijnonderbreking(en)	31.08.2022 t/m 18.10.2022
<input type="checkbox"/> besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen	
<input checked="" type="checkbox"/> aanpassing aanvraag	
<input checked="" type="checkbox"/> advies aan CCD	02.11.2022
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. **Eventueel horen van aanvrager:**
N.v.t.
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - **Datum:** 31.08.2022
 - **Gestelde vraag/vragen:** zie Bijlage I
 - **Datum antwoord:** 18.10.2022
 - **Verstrekt(e) antwoord(en):** Zie bijlage I
 - **De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag:**
10. **Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC):**
N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

- 1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.** (Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies). JA
- 2. De aanvraag betreft** een nieuwe aanvraag.
- 3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?** JA
- 4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. NVT.**

C. Beoordeling (inhoud)

- 1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft** (Zie bijlage I handreiking 'Invulling definitie project volgens de versie 2022'; zie bijlage III voor CCD-toelichting en voorbeeld).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het project lijkt de meeste kenmerken te hebben van voorbeeld 1A uit de Handreiking 'Invulling definitie project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De **5.1 lid2h** vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de **5.1 lid2h** van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

- 2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).**

Voor zover de **5.1 lid2h** de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. Het project heeft weliswaar kenmerken van toxicologisch onderzoek, maar kan beter als farmacologisch onderzoek worden bestempeld.

- 3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.**

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek. Er wordt namelijk onderzoek gedaan naar de effecten van specifieke voedingssupplementen op het sympathisch zenuwstelsel. Op basis van de resultaten kunnen consumenten beter ingelicht worden over de veiligheid van deze supplementen. Als de stoffen inderdaad gevaarlijk blijken, geeft dit aanleiding om de stoffen te verbieden. Zo kan mogelijk ernstige gezondheidsschade (bijv. hartaanval, hersenbloeding, sterfte) voorkomen worden.

Belangen en waarden

- 4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld** (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C4; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

Het directe doel (tevens uiteindelijke doel) van dit project is om de effecten van "trace-amine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op het sympathisch zenuwstelsel te bestuderen om zo bij te dragen aan de risicobeoordeling en stimulatie van handhaving van deze stoffen. Op basis van vooraf uitgevoerde *in vitro* studies, zullen de meest potente en effectieve stoffen worden geselecteerd om verder te onderzoeken in *in vivo* en *ex vivo* studies (in ratten). *In vivo* worden acute cardiovasculaire effecten gemeten en aansluitend worden met dezelfde ratten *ex vivo* directe sympathomimetische effecten op de adrenerge receptoren in mesenteriale weerstandsvaten bestudeerd.

Er is daarmee binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De 5.1 lid2h acht het waarschijnlijk dat binnen de duur van het project een uitspraak gedaan kan worden over het mogelijke gevaar van (nieuwe) "trace-amine"- en catecholamine-achtige stoffen die gebruikt worden als voedingssupplementen voor sportprestatiebevordering.

De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele/fundamentele project dat gericht is op het testen van de cardiovasculaire risico's van bepaalde voedingssupplementen bedoeld voor sporters zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/gebruikers van voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn:

De fundamentele waarde van leven zal de dieren in het kader van voorgesteld onderzoek ontnomen worden. Daarnaast zullen de dieren aangetast worden in hun integriteit en mogelijkheid tot uitoefening van soorteigen gedrag door de experimentele handelingen – te weten anesthesie, aanbrengen van telemetrische apparatuur om bloeddruk, hartslagfrequentie, hartslagcontractiekracht (inotropie) en lichaamstemperatuur te meten, aanbrengen van een canule, toediening van teststoffen hetgeen ook leidt tot ongerief gedurende de proeven en uiteindelijk doden.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden:

De onderzoekers zullen kennis verkrijgen over de cardiovasculaire effecten van de teststoffen.

Waarden die voor (toekomstige) sporter/gebruiker bevorderd worden:

Indien de stoffen duidelijke cardiovasculaire effecten laten zien zal dit gerapporteerd worden aan de NVWA die vervolgens de producten van de markt kan laten halen. Hierdoor kunnen de risico's van gebruik van voedingssupplementen verminderd worden.

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

Voor zover de 5.1 lid2h de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

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

Voor zover de **5.1 lid2h** kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met het opzetten van *in vivo* dierstudies (de telemetrische afleidingen) en myograafstudies met ratten (de *ex vivo* studies). Men zal middels dit project de kennis ook overdragen aan junior onderzoekers zodat de kennis behouden blijft binnen het instituut.

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

De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij wetenschappelijke inzichten aangaande 'cardiovasculaire effecten' en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de **5.1 lid2h** leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C1; zie bijlage III voor CCD toelichting en voorbeelden).

- ~~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 (13e, lid 3)~~

Niet van toepassing.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De 5.1 lid2h heeft zich ervan verzekerd dat dit het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van het ondertekende aanvraagformulier en punt C in de bijlage.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C2).

De 5.1 lid2h acht het ongerief realistisch ingeschat, zoals weergegeven in paragraaf F van de bijlage. Het meeste ongerief (matig) wordt veroorzaakt door de operatie waarbij telemetrische apparatuur wordt ingebracht en een permanente canule aangelegd wordt. Dit maximale niveau van ongerief (matig) wordt verwacht voor 100% van de dieren. De verwachte mate van ongerief is in lijn met de EU-richtlijn.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C2). (zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen – te weten anesthesie, een operatie om telemetrische sensors aan te brengen en een permanente canule, toediening van teststoffen – de cardiovasculaire effecten daarvan en uiteindelijk het doden van de dieren t.b.v. de daarop volgende *ex vivo* studies. De integriteit zal hierbij ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren slechts beperkt natuurlijk gedrag kunnen vertonen.

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

Naar de mening van de 5.1 lid2h zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven. Er was 1 humaan eindpunt waar de 5.1 lid2h een vraag over gesteld had: *Kunt u aangeven of er duidelijke criteria zijn voor (aanhoudende) verandering in cardiovasculaire parameters om deze als een humaan eindpunt te kunnen definieëren? Zo ja, welke zijn dat dan? Zo nee, hoe gaat u dan het welzijn bewaken d.m.v. tijdige toepassing van humane eindpunten?*

De humane eindpunten zijn hierop aangepast: De maximale toename in bloeddruk die in deze studie gehanteerd wordt is 50 mmHg. Voor de hartslagfrequentie wordt een maximale toename van 100 slagen/minuut aangehouden.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C3).

De **5.1 lid2h** is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel. De aanvragers gebruiken overigens ook *in vitro* experimenteel onderzoek, voor de selectie van de stoffen die daadwerkelijk *in vivo* getest zullen gaan worden (zie paragraaf G in de bijlage).

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

Naar de mening van de **5.1 lid2h** is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijk resultaat gebaseerd op eerder verkregen data en zal verder ondersteund worden met statistische analyse middels een poweranalyse in de hieruit volgende werkprotocollen. Er was door de DEC wel gevraagd een duidelijk(er) uitleg te geven van de gevraagde dieraantallen. Dat is gebeurd (zie paragraaf B in de bijlage).

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

De **5.1 lid2h** heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de **5.1 lid2h** onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken alsmede de humane eindpunten.

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

Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

(Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C3; zie bijlage III voor CCD-voorbeeld).

De onderzoeker gebruikt ratten van zowel het mannelijke als het vrouwelijke geslacht om zo de gebruikersgroep van de voedingssupplementen in de samenleving na te bootsen. Er zijn echter wel verschillen in cardiovasculaire regulatie door het sympathisch zenuwstelsel (verwijzend naar referentie 5), daarom zijn er in deze studie extra dieren nodig om interferentie van effecten van geslachtsverschillen uit te sluiten. De **5.1 lid2h** is van mening dat de aanvrager hiermee in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met de verschillende geslachten uit te voeren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. (Zie bijlage II 'Praktische handreiking ETK': Stap 1.C3).

Naar de mening van de **5.1 lid2h** is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager, want de dieren worden gedood in het kader van de proef omdat de mesenteriale bloedvaten en hersenen worden geïsoleerd voor de (aansluitende) ex vivo studies.

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

Niet van toepassing.

NTS

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

Naar de mening van de **5.1 lid2h** is dat het geval.

D. Ethische afweging

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

Weegt in het voorgestelde onderzoek naar de cardiovasculaire effecten van "trace-amine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt aangedaan?

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

- Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel (dieren ondergaan ongerief en worden uiteindelijk gedood)
- Waarden die voor de doelgroep (sporters) bevorderd worden: substantieel voordeel (reductie van cardiovasculaire risico's)
- Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel. De kans dat onderzoekers meer inzicht krijgen in de mogelijke cardiovasculaire effecten van elementen uit voedingssupplementen, en dat onderzoekers hierover kunnen rapporteren aan de NVWA en publiceren is realistisch.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de belangen van gebruikers van prestatiebevorderende voedingssupplementen zwaarder wegen dan de belangen en waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen (voornamelijk een operatie onder anesthesie met aanbrengen van telemetrische sensoren en een permanente canule) en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast vanwege de standaard huisvesting.

Het is aannemelijk dat de doelstelling (bepaling van mogelijke cardiovasculaire effecten van bepaalde voedingssupplementen) behaald zal worden. De **5.1 lid2h** heeft de onderzoeker wel gevraagd te verklaren dat dit werk niet valt onder 'regulier toxicologisch onderzoek'. Zij hebben verklaard dat dit niet het geval is omdat het hier primair gaat om fysiologisch onderzoek. Onderzoek dat zij goed kunnen uitvoeren vanwege hun specialisatie.

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

De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag 'weegt het onderzoek naar de cardiovasculaire effecten van "trace-amine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt aangedaan?' bevestigend.

De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar mening weegt echter het substantiële belang van dit project, en meer specifiek de (substantiële) belangen van de gebruikers van voedingssupplementen, zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering van de dieren.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende *go/no-go* momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de **5.1 lid2h** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel 'Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen' als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de **5.1 lid2h** het projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies is **niet unaniem** tot stand gekomen. Eén DEC-lid nam een minderheidsstandpunt in. Sporters zijn een belangrijke uiteindelijke stakeholder in dit project dat gericht is op het bepalen van de veiligheid van sportvoedingssupplementen. Sportvoedingssupplementen die op de markt zijn kunnen onveilig zijn, omdat de veiligheid ervan niet van tevoren vastgesteld hoeft te worden door producenten. In dit onderzoek worden ratten ingezet om deze veiligheid te bepalen. Bescherming van sporters kan echter ook gepromoot worden door weet-wat-je-eet-achtige publieke campagnes in plaats van het inzetten van proefdieren. Sporters hebben uiteindelijk een eigen verantwoordelijkheid. In die zin is dit onderzoek *maatschappelijk* vervangbaar. Op basis hiervan, en gekoppeld aan het matige ongerief voor de dieren, kwam dit DEC-lid tot een negatief advies.

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

Een knelpunt is de vraag of dit soort veiligheidsonderzoek dat (in dit geval) voortkomt uit een NVWA rapport over risico's van nieuwe voedingssupplementen opgepakt moet worden bij een universiteit, ook al hebben ze de wetenschappelijke expertise. Is dat wel een taak voor een universiteit?

Een ander knelpunt betrof de vraag hoe het belang van een dierproef ingeschat moet worden dat uiteindelijk ten dienste staat van verhoging van de individuele performance binnen een sport.

Bijlage I:

Vragen 5.1 lid2h d.d. 31-08-2022 en Antwoorden VO 18-10-2022

5.1 lid2h

Afzender

5.1 lid2e

5.1 lid2h

Datum: 11 oktober 2022

Onderwerp: projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216336/PV 2022-007

Bijlage: beantwoording van de fundamentele vragen

Geachte leden van de 5.1 lid2h,

Hartelijk dank voor de kundige feedback die wij hebben mogen ontvangen op ons onderzoeksvoorstel.

De gegeven feedback en de fundamentele vragen zoals geformuleerd door de commissie zijn gebruikt om ons projectvoorstel verder te verduidelijken en te verbeteren. De antwoorden op de gestelde vragen kunt u terugvinden in de bijlage van deze brief. De wijzigingen in het projectvoorstel en in Appendix 1 zijn grijs gemarkeerd. Daarnaast zijn de geadviseerde wijzigingen voor de NTS doorgevoerd in het bijgeleverde Excel-bestand. Vanwege het format van dit Excel-bestand is een grijze markering van de wijzigingen niet mogelijk, maar wij hebben de wijzigingen in een apart word-document grijs gemarkeerd.

Wij zien uw reactie graag tegemoet.

Met vriendelijke groet,
namens alle leden van de onderzoeksgroep,

5.1 lid2e,

Bijlage: beantwoording van de fundamentele vragen

1. Standaard reflectievraag aan onderzoeker(s): **Waarom weegt voor de onderzoeker cq. onderzoeksgroep het belang van het voorgestelde project zwaarder dan het matige ongerief, de schending van integriteit en de beëindiging van het leven dat de proefdieren wordt aangedaan? Wellicht kunt u hierin meenemen dat het een vrijwillige keuze is van sporters om voedingssupplementen te nemen en de (klaarblijkelijke) keuze van de overheid om voedingssupplementen op de markt toe te laten waarvan niet is aangetoond dat de diverse componenten veilig zijn voor gebruikers.**

Reactie: Het belang van het project weegt zwaarder, omdat het gebruik van sport- en/of gewichtsverliessupplementen op grote schaal mogelijk tot gezondheidsschade kan leiden, zoals blijkt uit meerdere casussen. In de huidige situatie staat de overheid voedingssupplementen op de markt toe waarvan niet is aangetoond dat deze veilig zijn voor gebruikers. De voedingsmiddelenwetgeving verschilt van de geneesmiddelenwetgeving, waarbij bij deze laatste veiligheid aangetoond dient te worden voordat deze toelaatbaar zijn op de geneesmiddelenmarkt. Voor de voedingswet is dit andersom. Zolang niet kan worden aangetoond dat iets onveilig is, is het toelaatbaar en kan niet worden geweerd van de markt (zie artikel van Biesterbos et al. 2019 voor een gedetailleerdere uitleg over de wetgeving). Het is inderdaad een vrijwillige keuze van sporters en andere consumenten om deze voedingssupplementen te consumeren. Doordat deze middelen op een legale en gemakkelijke wijze verkrijgbaar zijn, wordt het beeld gecreëerd dat deze middelen ook veilig bevonden zijn. Dat laatste is echter niet het geval. Consumenten kunnen enkel een goede keuze maken voor het gebruik van dit soort voedingssupplementen wanneer er achtergrondinformatie over de componenten in deze supplementen beschikbaar zijn. Deze achtergrondinformatie ontbreekt voor het grootste gedeelte van de componenten. Dit kennishiaat willen wij middels dit onderzoek opvullen. Meer inzicht in de mogelijk gevaarlijke effecten van deze supplementen kan er niet alleen voor zorgen dat consumenten beter geïnformeerd kunnen worden, maar kan ook bijdragen aan een mogelijke verandering van wetgeving van zulke voedingssupplementen.

Ref.: Biesterbos JWH, Sijm DTHM, van Dam R, Mol HGJ. A health risk for consumers: the presence of adulterated food supplements in the Netherlands. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2019 Sep;36(9):1273-1288. doi: 10.1080/19440049.2019.1633020. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31294678.

-3.1 Background t.a.v. i-Achtergrondbeschrijving

2. De 5.1 lid2h vraagt zich af of de gekozen categorie fundamenteel/translatieel onderzoek hier van toepassing is. Het leest als een toxicologisch onderzoek. Valt dit wel of niet onder wettelijk verplicht onderzoek? Bent u dat nagegaan?

Reactie: Dit onderzoek valt niet onder wettelijk verplicht onderzoek. De stoffen die wij gaan onderzoeken bootsen de activatie van het sympathisch zenuwstelsel na. Dit hoeft niet per definitie schadelijk of toxisch te zijn, maar deze stoffen kunnen wel farmacologisch actief zijn.

3. Is de NVWA opdrachtgever voor dit project? Dat wordt gesuggereerd in de tekst.

Reactie: De NVWA is niet de officiële opdrachtgever, maar een academische partner in dit project. Dit onderzoek draagt bij aan de kennisverrijking van het onderzoeksbureau van de NVWA. Het gedeelte in de tekst waarin wordt aangegeven dat de NVWA de opdrachtgever is, is aangepast.

4. U zegt niets over de transleerbaarheid van uw resultaten bij een rat naar de mens, terwijl dat is wat u wilt. Hoe transleerbaar zijn deze resultaten? Is daar iets over bekend?

Reactie: Het adrenerge systeem van de rat en de mens is vergelijkbaar. Bijvoorbeeld, activatie van de beta1-receptor verhoogt zowel in rat als mens de hartslagfrequentie. De studie van Vago et al. (1984) laat daarnaast zien dat het aantal, de affiniteit en de heterogeniteit van beta-receptoren in de linker ventrikel van de mens overeenkomt met die van de rat. Cardiovasculaire effecten van de voedingssupplementen in ratten kunnen daarom een belangrijke indicatie vormen voor eenzelfde soort effecten in mensen.

Ref.: Vago T, Bevilacqua M, Dagani R, Meroni R, Frigeni G, Santoliss C, Norbiato G. Comparison of rat and human left ventricle beta-adrenergic receptors: subtype heterogeneity delineated by direct radioligand binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 May 31;121(1):346-54. doi: 10.1016/0006-291x(84)90729-0. PMID: 6329198.

t.a.v. ii-3V's

5. Hoe verhoudt zich dit voorstel tot bv de ontwikkelingen op het gebied van testen van toxicologie van (nieuwe) chemische verbindingen in 'new approach methods', zoals in het project virtual human? Of het human toxicology consortium?'

Reactie: In dit project zullen we ook gebruik maken van "new approach methods" (NAMs), namelijk een in silico farmacokinetische model (PBK-model). De huidige PBK-modellen zijn echter nog niet zo goed dat ze op zichzelf een bijdrage kunnen leveren aan beleid- en besluitvorming. Een in vivo dierstudie kan beter voorspellende resultaten geven voor het gebruik van risicobeoordelingen van deze stoffen in mensen. Daarnaast vormen structuur-activiteitsrelaties, die gemaakt kunnen worden door data verkregen uit deze in vivo studie, een opstap naar andere NAMs, zoals voorspellen van de werkzaamheid op basis van de structuur (read-across). De NAMs in dit project kunnen een bijdrage leveren aan de transleerbaarheid van deze in vivo dierstudie naar de mens.

6. Welke toxiciteitstesten kunnen uitgevoerd worden in vitro/ex vivo? Kunnen deze studies uitgevoerd worden bij mensen of zijn er epidemiologische studies beschikbaar?

Reactie: Zoals eerder genoemd, is dit onderzoek geen toxicologisch onderzoek. De gedeelten in de tekst die dit suggereren, zijn aangepast. Dit onderzoek is een farmacologisch onderzoek, waarbij gebruik wordt gemaakt van farmacologische assays, zoals de in vitro receptoractivatie assays, de ex vivo vaatfunctieassays en de ex vivo synaptosomale assays. Deze assays kunnen helaas niet uitgevoerd worden bij mensen. Er zijn geen epidemiologische studies beschikbaar over de effecten van voedingssupplementen op het sympathisch zenuwstelsel. Daarnaast kan dit onderzoek niet in mensen uitgevoerd worden, omdat wij willen kijken naar acute effecten. Dit kan alleen door deze stoffen intraveneus toe te dienen in mensen, maar hiervoor zijn geen farmaceutische formuleringen beschikbaar die intraveneus toegediend mogen worden in mensen.

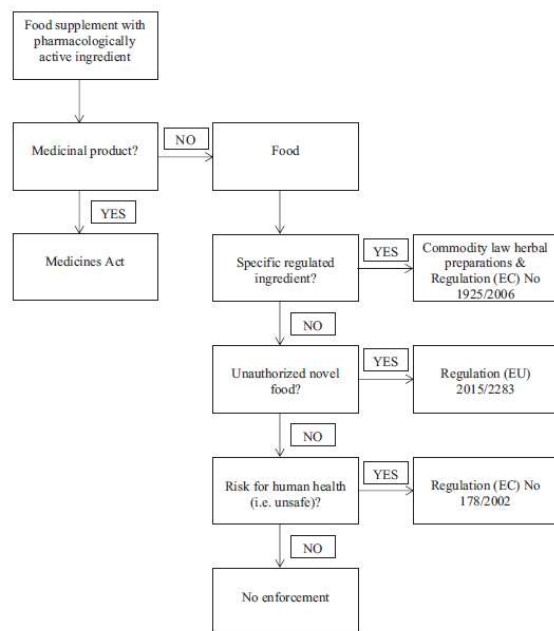
-3.2 Doel *t.a.v. ii-3V's*

7. Kennisoverdracht naar junior-onderzoekers is beschreven als onderdeel van het doel. Kan dit ook (deels) als training on the job plaatsvinden?

Reactie: Kennisoverdracht staat niet beschreven als doel, maar als een middel voor waarborging van het doel. Deze training zal on the job plaatsvinden, maar omdat het een training betreft, zijn er wel extra dieren nodig.

- 3.3 Belang t.a.v. i-Achtergrondbeschrijving

8. U brengt op dat producenten van voedingssupplement steeds weer nieuwe stoffen ontwikkelen voor gebruik in hun supplementen, doordat zij kleine chemische aanpassingen doen aan bestaande farmacologisch actieve stoffen "waardoor er een nieuwe stof ontstaat en de bestaande regulering wordt omzeild". Wat voor soort regulering wordt er hier bedoeld? M.a.w. waarom is dat een probleem?



Reactie: Dit is een probleem, want zolang er geen gegevens zijn die aantonen dat een chemische stof in een voedingssupplement onveilig is, zal er geen handhaving plaats kunnen vinden. Bovendien kunnen mensen deze stoffen consumeren, met het beeld dat het veilig is (omdat het legaal is), terwijl veiligheid niet is aangetoond. Voor de regulering verwijzen wij naar de onderstaande figuur uit het artikel van Biesterbos et al. (2019). Hierin worden de handhavingmodelijkheden beschreven die de NVWA heeft wanneer een farmacologisch actieve stof in een voedingssupplement wordt gevonden. Het laat zien dat wanneer het niet om een gereguleerd ingrediënt gaat (volgens regulatie EC 1925/2006) en het ook niet om een 'novel food' gaat (EU regulatie 2015/2283) en er niet aangetoond kan worden dat iets een risico voor de humane gezondheid vormt, dat er dan geen handhaving kan plaatsvinden.

Ref.: Biesterbos JWH, Sijm DTHM, van Dam R, Mol HGJ. A health risk for consumers: the presence of adulterated food supplements in the Netherlands. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2019 Sep;36(9):1273-1288. doi: 10.1080/19440049.2019.1633020. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31294678.

9. U geeft zelf al aan dat fabrikanten stoffen regelmatig aanpassen. Dat betekent dat uw onderzoek bij kan dragen aan het reguleren van de huidige generatie stoffen, maar dat er waarschijnlijk in de toekomst herhaling van testen moet plaatsvinden om nieuwe generaties te kunnen reguleren. Zou het onderzoek niet gericht moeten zijn op deze categorie van stoffen in combinatie met een aanpassing van de wet zodat niet individuele stoffen, maar groepen van stoffen met een sympathicomimetische werking in preparaten verboden kunnen worden?

Reactie: Ja, er moet ook gewerkt worden aan aanpassing van de wet om stofgroepen te verbieden. Dit wordt momenteel ook gedaan door een EU commissie met leden uit meerdere lidstaten, maar dat is niet onderdeel van dit project. Aanpassing van wetgeving is een langzaam proces is. Daarom loopt dit onderzoek parallel aan het wetgevingsproject. In de tussentijd wordt er doorgewerkt om potentieel (acuut) gevaarlijke stoffen te identificeren, waardoor deze van de markt gehaald kunnen worden. Bovendien zal dit onderzoek resultaten opleveren die gebruikt kunnen worden voor argumentatie van het verbieden van bepaalde stofklassen. De structuur-activiteitsrelaties die mogelijk uit dit onderzoek naar voren komen, kunnen gebruikt worden voor NAMs en kunnen een fundamenteel vormen voor het verbieden van bepaalde stofklassen in voedingssupplementen.

-3.4 Strategie

3.4.1 Overzicht algemene projectopzet

t.a.v. i-Achtergrondbeschrijving

10. Een moeilijkheid bij dit type onderzoek is dat men stoffen gaat selecteren op basis van in vitro (tox) data zonder te weten in hoeverre deze stoffen daadwerkelijk opgenomen (gaan) worden, waardoor concrete gegevens over (de werkelijk in de mens) circulerende concentraties ontbreken op het moment dat in vivo studies (i.v. in de rat) gestart gaan worden. Hoe kijkt u als onderzoeker naar deze "intrinsieke beperking"?

Reactie: Momenteel zijn wij in de afrondende fase van in vitro darmopname studies (met de humane cellijn Caco-2 in transwell) voor de geselecteerde stoffen. Deze studies zijn geen onderdeel van de selectiecriteria voor de in vivo studies, omdat we geïnteresseerd zijn in structuur-activiteitsrelaties (van sympathische activatie) en daarbij speelt biologische beschikbaarheid geen rol. Ook wordt er gewerkt aan in vitro metabolisme studies met humaan lever homogenaat (S9). Beide in vitro studies leveren bijdrage aan voorspelling van in vivo plasmaconcentraties met behulp van het eerdergenoemde in silico PBK-model (NAM), hierdoor zien wij dit niet als een beperking van het onderzoek.

t.a.v. iii-Onderzoeksopzet

11. Op basis van welke criteria worden de "meest maatschappelijk relevante" stoffen geselecteerd?

Reactie: Onder maatschappelijk relevante stoffen verstaan wij stoffen die (a) (in vitro) biologisch actief zijn en (b) die (legaal) op de markt beschikbaar zijn. Dit kan samen zorgen voor maatschappelijke implicaties. Criteria voor de stoffenselectie voor de in vivo studie zijn in vitro EC₅₀ waardes kleiner dan 10 µM en in vitro E_{max} waardes groter dan 70% van het maximale effect. Voor de beschikbaarheid van de stoffen verwijzen wij naar de studie van Biesterbos et al. (2019), waarin een hele reeks aan stoffen zijn gepresenteerd, die (chemisch analytisch) gedetecteerd zijn in voedings supplementen.

Ref.: Biesterbos JWH, Sijm DTHM, van Dam R, Mol HGJ. A health risk for consumers: the presence of adulterated food supplements in the Netherlands. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2019 Sep;36(9):1273-1288. doi: 10.1080/19440049.2019.1633020. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31294678.

12. U geeft aan de rat als diermodel te kiezen omdat het cardiovasculair systeem vergelijkbaar is met dat van de mens. Gaat dit argument ook op voor de hersenstudies die u wilt gaan doen in dit project?

Reactie: Wat betreft de hersenstudies is de rat misschien niet het meest optimale model, vanwege enkele verschillen in potentie van een aantal stoffen voor de Taar1/TAAR1 receptor in rat en mens. Echter, is dit wel de best mogelijk optie, omdat het zeer moeilijk is om aan vers humaan hersenweefsel te komen.

13. Waarop zijn maximaal 5 te testen stoffen (inclusief dosis escalatie per stof) per dier gebaseerd?

Reactie: Deze aantallen zijn gebaseerd op de geschatte maximale houdbaarheid van de i.v. canule van ongeveer 10 weken. Dit is geschat op basis van eerdere ervaring, in overleg met de IVD.

14. Welk principe van dosis escalatie wordt gehanteerd?

Reactie: Er wordt gebruik gemaakt van een farmacologisch relevante dosering, geschat op basis van plasmawaarden van vergelijkbare stoffen en gemeten plasmawaarden voor een aantal van deze stoffen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van toename in dosering in half-logaritmische stappen. Hogere doseringen worden toegediend indien na het induceren van een effect een plateau is bereikt. Dit wordt voor de opvolgende, toenemende, doseringen herhaald, om uiteindelijk een ED₅₀ waarde te kunnen vaststellen.

15. Figuur 2 lijkt besliscriteria te suggereren in de pilotstudies, waarbij significante verschillen dienen behaald te worden, terwijl tekst aangeeft dat pilotstudies nodig zijn voor training. Graag in overeenkomst brengen. Is adrenaline bij 3.1 en acetylcholine/kalium/tyramine bij 3.2 dan de positieve controle?

Reactie: De tekst en de besliscriteria in Figuur 2 zijn in overeenkomst gebracht. Bij 3.1 is adrenaline de positieve controle en bij 3.2 is acetylcholine/kalium/tyramine de positieve controle.

t.a.v. iv-Ongerief

16. T.a.v. de dodingsmethoden: de uitleg is helder en acceptabel. Alleen wil de DEC adviseren de cervicale dislocatie als optie te verwijderen omdat dit sowieso geen geschikte methode is voor volwassen ratten.

Reactie: Cervicale dislocatie als methode is verwijderd uit de tekst in het PV en de Appendix.

t.a.v. v-Aantallen x statistiek

17. Figuur 2: Zijn er tussen de in vitro studies (2) en de in vivo studies (3.1 en 3.2) go no-go criteria te definiëren? Hetzelfde geldt voor de overgang pilotstudie (3.1a en 3.2a) en de resterende studies.

Reactie: Er zijn tussen de *in vitro* studies (2) en de *in/ex vivo* studies (3.1 en 3.2) go/no-go-criteria te definiëren voor de selectie van teststoffen. Indien teststoffen in de *in vitro* studies (2) een EC₅₀ waarde kleiner dan 10 µM laten zien én een E_{max} waarde groter dan 70% van het maximale effect, dan is dit een "go" voor zowel de *in vivo* (3.1) als de *ex vivo* (3.2) studies. Als er niet aan deze criteria wordt voldaan, dan geldt er een no-go voor continuering met deze stoffen in de stappen 3.1 en 3.2. Ook zijn er go-criteria van de pilotstudies naar de resterende studies (3.1b, 3.2b en 3.2c) opgenomen in Figuur 2. In Figuur 2 op blz. 9 van het PV zijn deze aanpassingen doorgevoerd.

18. Vervolg vraag t.a.v. selectiemomenten. Als er bijvoorbeeld op model 1 (in vivo CV effecten) niets wordt waargenomen, is model 2 (ex vivo) dan zinvol?

Reactie: Tussen de *in vivo* en de *ex vivo* studies vindt er geen selectiemoment plaats. Indien er bijvoorbeeld geen effecten van een teststof in de *in vivo* studie worden waargenomen, dan is bestudering van de teststof in de *ex vivo* studies nog steeds uiterst zinvol. *In vivo* kan een stof bijvoorbeeld snel geklaard worden, waardoor er geen cardiovasculaire effecten worden waargenomen. Een *ex vivo* studie kan in dat geval laten zien dat deze stof wel farmacologisch actief is. Beide modellen geven waardevolle farmacologische informatie en zijn relevant om onafhankelijk van elkaar mee te nemen in het project.

3.4.2 Onderbouwing gekozen strategie

t.a.v. iii-Onderzoeksopzet

19. De 5.1 lid2h begrijpt dat 'De keuze gaat uit naar intraveneuze blootstelling in de in vivo studies om invloed van de biologische beschikbaarheid uit te sluiten'. De intrinsieke beperking hiervan is echter dat er minder metabolisme zal plaatsvinden omdat de eerste passage van de lever – die normaal plaatsvindt na opname via de darmen – wordt "omzeild". Wat is uw visie op deze beperking met de gekozen stofklassen in gedachte?

Reactie: Het doel van deze studies is om puur naar acute, cardiovasculaire, effecten van de teststoffen te kijken. Orale toediening kost tijd en maakt het moeilijker om ED₅₀ waardes vast te stellen. Daarnaast kan de biologische beschikbaarheid in de rat verschillen van de mens. Darmopname en metabolisme door de lever worden in dit project in humane *in vitro* modellen onderzocht. Deze *in vitro* studies kunnen later ingezet worden voor de translatie van deze *in vivo* rat studie naar de mens.

20. Kan de binding van de verschillende stoffen aan plasmaproteïnen nog een mogelijke rol spelen bij de keuze van de concentratie en de uiteindelijke effecten?

Reactie: De binding van de verschillende teststoffen aan plasmaproteïnen kan inderdaad mogelijk een rol spelen bij de keuze van de concentratie en de uiteindelijke effecten. Dit is echter iets wat zich voor kan doen in iedere *in vivo* studie, ook in een humane *in vivo* studie. In de ex vivo studies wordt dit omzeild.

APPENDIX 1 A. Experimentele aanpak

t.a.v. iii-Onderzoeksopzet

21. Er wordt naar de volgende (er wordt verondersteld een hogere) dosis overgegaan zowel als er wel als geen effect is bij een lagere dosering. Waarom ook als er een effect optreedt? Wordt er gezocht naar MTD?

Reactie: Nee, er wordt niet gezocht naar de "maximum tolerable dose" (MTD). Wel wordt er gekeken naar de "no observed adverse effect level" (NOAEL) en de "lowest observed adverse effect level" (LOAEL), welke voor de farmacologische karakterisering van belang zijn. Ook wordt er op een hogere dosis overgegaan om een ED₅₀ waarde vast te kunnen stellen.

22. Kunt u de opzet meer specificeren? Hoe gebeurt de dosis escalatie? Fibonacci? Op welke basis is er gekozen voor 8 concentraties? Wat gebeurt er als er een DLT of MTD bereikt wordt?

Reactie: Er wordt gebruik gemaakt van een farmacologisch relevante dosering, geschat op basis van plasmawaarden van vergelijkbare stoffen en gemeten plasmawaarden voor een aantal van deze stoffen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van toename in doseringen in half-logaritmische stappen om een Log-dose-response curve te kunnen construeren. Hogere doseringen worden toegediend indien na het induceren van een effect een plateau is bereikt. Dit wordt voor de opvolgende, toenemende, doseringen herhaald, om uiteindelijk een ED₅₀ waarde te kunnen vaststellen.

23. Worden voor de meting van de catecholamines bloedmonsters benodigd? Zo ja, wanneer worden deze afgenomen?

Reactie: Het cardiovasculair systeem is erg gevoelig voor vulling van het vaatstelsel. Het afnemen van bloed kan tot bijeffecten leiden. Om dit risico te voorkomen wordt er geen bloed afgenomen.

24. U schrijft "Indien er een effect optreedt en dit effect stabiliseert, dan wordt een volgende, hogere, dosis van de concentratiereeks toegediend. Indien er bij de laagste concentratie geen effect optreedt, zal er overgegaan worden op de volgende dosis in de reeks." Hoe lang wacht u echter op een effect? M.a.w. wat is de tijdsduur waarin u kijkt naar het optreden van effecten?

Reactie: De verwachting is dat de effecten na i.v. toediening binnen 5 à 20 minuten zullen optreden. Hierbij bouwen we een marge in en houden we maximaal 30 minuten aan als wachttijd om een effect te observeren.

t.a.v. iv-Ongerief

25. U geeft aan dat wanneer i.v. canules langer dan 5 weken gebruikt worden, uitval toeneemt. Heeft u overwogen om minder stoffen per dier te testen om zo de duur dat dieren in experiment zijn, te verkorten en uitval – met mogelijk geassocieerd ongerief - te verminderen?

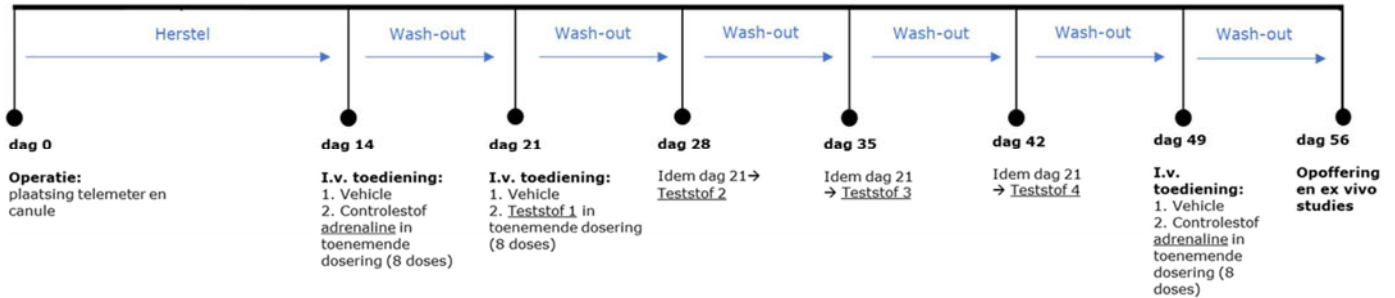
Reactie: Ja, dat hebben we overwogen. Echter, wanneer minder stoffen per dier worden getest heeft dit tot gevolg dat er meer dieren nodig zijn. Dit betekent dat er ook meer dieren het gehele experiment en dus mild ongerief zullen ondergaan. Hierdoor hebben wij de afweging gemaakt om zo min mogelijk dieren in te zetten voor deze studies. Bovendien wordt de statistische power beter als er in 1 individu meerdere stoffen getest worden, omdat de invloed van de interindividuele variatie wordt verminderd.

B. De Dieren

t.a.v. v-Aantallen x statistiek

26. De beredenering van het aantal dieren is onvoldoende navolgbaar. Kunt u dat beter duiden? Bijvoorbeeld: 20 dieren voor training van medewerkers, blijven er 80 over waarbij 20% uitval wordt verwacht, dan blijven er 64 over voor het testen van 5 stoffen (of concentraties) per dier = 320 condities. En u wilt 10 stoffen testen bij 8 concentraties; dan kan elke concentratie $320/(8 \times 10) = 4$ maal getest worden. Dat lijkt allezins redelijk en kan idd verder ondersteund worden door power calculaties. Verder benoemt u in de sectie 'geslacht' dat er wellicht extra dieren nodig zijn om geslachtsverschillen te kunnen duiden: hoe denkt u dat dit doorwerkt op de genoemde aantallen/bepalingen? De 5.1 lid2h vroeg zich ook nog af of u hierbij nog controle-stoffen moet meenemen? (zijn die wel/niet geïncludeerd?).

Reactie: De controlestof adrenaline wordt op een aparte meetdag i.v. toegediend in toenemende dosering. Dit wordt gedaan een week voor toediening van de eerste teststof en een week na toediening van de laatste, vierde, teststof in een dier. Dit is verduidelijkt in de grijs gemarkeerde delen in het PV en de Appendix. Ook is dit aangegeven in onderstaande tijdslijn, die ook opgenomen is in de Appendix. Deze tijdslijn laat de procedures zien die 1 dier ondergaat, mits alle omstandigheden dit toelaten.



Het aantal dieren is als volgt berekend: er zullen maximaal 10 teststoffen + controlestof adrenaline bestudeerd worden met een $n=8$ (totaal dus 11 stoffen). Er zullen dus 88 metingen zijn ($11 \times 8 = 88$). Als er uitgegaan wordt van het worst-case scenario, dat er per dier slechts 1 stof gemeten kan worden, dan zijn er 88 dieren nodig voor de $n=8$ van de 11 stoffen. Hiervan wordt voor maximaal 20% (18 dieren) uitval verwacht. Daarom zijn er bovenop de 88 dieren nog 18 extra dieren aangevraagd. In dat geval zijn er 106 dieren met de intentie om hierin 4 teststoffen en controlestof adrenaline per dier te onderzoeken. Dan kunnen er in het meest gunstige scenario 530 condities onderzocht worden ($106 \times 5=530$), wat betekent dat iedere teststof 48 keer bestudeerd kan worden ($530 \text{ condities}/11 \text{ stoffen} = 48,2$ herhalingen per stof). Er zijn echter maar 8 herhalingen per stof nodig ($n=8$), wat aangeeft dat waarschijnlijk niet alle dieren nodig zullen zijn om deze studie uit te voeren, uitgaande van een gunstig scenario. In het werkprotocol zal dit verder toegelicht worden middels de powerberekening.

Het kan zijn dat er geslachtsverschillen optreden. Daarom wordt een gelijke verdeling gemaakt tussen de geslachten zodat de teststoffen vier keer in mannelijke ($n=4$) en vier keer in vrouwelijke ratten ($n=4$) onderzocht worden.

27. Het aantal van 20 pilot dieren is onvoldoende onderbouwd. Hoeveel mensen moeten opgeleid/getraind worden?

Reactie: Op basis van eerdere ervaringen met het trainen van dieranalisten is er een maximaal aantal van 20 dieren nodig om twee dieranalisten op te leiden voor de experimentele procedures.

28. U geeft aan power calculatie te gebruiken voor het bepalen van de groepsgroottes en ook dat er meer dieren nodig zijn vanwege het gebruik van beide geslachten.

Zijn de effectsizes voor alle uitleesparameters hetzelfde? Wat is de effectsize en de variatie die ten grondslag ligt aan de gekozen n van 6.4 dieren per groep?

Reactie: Er wordt voor alle uitleesparameters uitgegaan van een effectgrootte van 20%. Dit komt ongeveer overeen met de toename in de uitleesparameters wanneer een individu zich inspant (ten opzichte van de uitleesparameters in rusttoestand). Bijvoorbeeld, in de studie van Cornelissen et al. (2010) wordt er in de mens een hartslagfrequentie van 71.2 slagen/minuut gemeten in rusttoestand. Gedurende geringe inspanning is de hartslagfrequentie 97.5 slagen/minuut. Dit is een toename in effect van ongeveer 27%.

De n is niet 6.4, maar 8 dieren per teststof. De variantie die hieraan ten grondslag ligt is ongeveer 9%. In de studies van Maris et al. (2005), Cosson et al. (2007) en Blagonravov et al. (2018) zijn namelijk respectievelijk standaarddeviaties van 6.0, 12.0 en 8.3 % van het gemiddelde gerapporteerd voor basale systolische bloeddruk in volwassen WKY ratten. Het gemiddelde van deze standaarddeviaties is ongeveer 9%. In de powercalculatie in het werkprotocol zal dit verder toegelicht worden.

Ref.

Cornelissen, V., Verheyden, B., Aubert, A. et al. Effects of aerobic training intensity on resting, exercise and post-exercise blood pressure, heart rate and heart-rate variability. *J Hum Hypertens* 24, 175–182 (2010).

Maris, M. E., Melchert, R. B., Joseph, J. & Kennedy, R. H. Gender differences in blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 32, 35–39 (2005).

Cosson, E. et al. Aortic stiffness and pulse pressure amplification in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 292, 2506–2512 (2007).

Blagonravov, M. L. et al. 24-Hour Profile of Blood Pressure, Heart Rate, Excretion of Electrolytes, and Locomotor Activity in Wistar-Kyoto and SHR Rats Under Conditions of Free-Run Rhythm. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* (2018).

29. Onder A geeft u aan maximaal 60 dieren nodig te hebben, maar onder B geeft u 100 dieren aan. Graag dit consistent maken.

Reactie: Het beschreven aantal dieren is consistent gemaakt.

D. Pijn en welzijnsaantasting

t.a.v. iv-Ongerief

30. Gaan kooigenoten niet gaan knagen/bijten aan canule e.d.? Dient individuele huisvesting overwogen te worden?

Reactie: Er zal gestart worden met groepshuisvesting. Mocht er knaging aan de canule plaatsvinden, dan wordt er overgestapt op individuele huisvesting.

31. U geeft aan dat een experiment voor een dier beëindigd wordt wanneer "ritmestoornissen of hypo-of hypertensie die niet transient of corrigeerbaar zijn". Wat is niet corrigeerbaar? Hoe probeert u te corrigeren?

Reactie: Wanneer dit optreedt, zal eerst de toediening van teststof gestopt worden. Wanneer er dan na 30 minuten nog geen verbetering is in de cardiovasculaire homeostase, dan wordt het experiment beëindigd en zal het dier opgeofferd worden. Er zullen geen andere handelingen uitgevoerd worden om iets te corrigeren.

E. Humane eindpunten

t.a.v. iv-Ongerief

32. Het is een vorm van tox-studie door steeds hoger te gaan doseren en te onderzoeken wat er gebeurt. Kunt u aangeven of er duidelijke criteria zijn voor (aanhoudende) verandering in cardiovasculaire parameters om deze als een humaan eindpunt te kunnen definieëren? Zo ja, welke zijn dat dan? Zo nee, hoe gaat u dan het welzijn bewaken d.m.v. tijdige toepassing van humane eindpunten?

Reactie: Cumulatieve dosering is een gestandaardiseerde techniek in een farmacologische studie om dose-response curves te construeren. De maximale toename in bloeddruk die in deze studie gehanteerd wordt is 50 mmHg. Voor de hartslagfrequentie wordt een maximale toename van 100 slagen/minuut aangehouden.

F. Classificatie van ongerief

t.a.v iv-Ongerief

33. Een uitspraak over het cumulatieve ongerief voor de dieren ontbreekt nog. Is het juist dat 100% van de dieren cumulatief mild ongerief zal ondergaan?

Reactie: Ja, het is juist dat 100% van de dieren cumulatief mild ongerief zal ondergaan, waardoor het ongerief op matig wordt ingeschat. Door de repeterende toedieningen van de teststoffen (maximaal 5 weken na elkaar), bouwt het ongerief zich op.

G. Vervanging, vermindering, verfijning

t.a.v. ii-3V's

34. Is continue meting van de bloeddruk echt noodzakelijk? Kan niet ook volstaan worden met bijvoorbeeld 8 metingen per dag, zodat de studie mogelijk in mensen uitgevoerd kan worden? Het viel de 5.1 lid2h op dat u niet verwees naar deze 'landmark publication' in het kader van het onderwerp Vervanging. Kunt u de strekking van dit verhaal ook meenemen in uw uitleg van het project? <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4410863/>

Reactie: Het doel van deze studie is om acute effecten te kunnen waarnemen. Hiervoor is het noodzakelijk om de bloeddruk continu te meten. Indien dit niet met continue bloeddrukmeting gedaan wordt, kunnen er effecten, inclusief de effectpiek, gemist worden. Daarnaast zijn deze stoffen niet beschikbaar voor i.v. toedieningen in mensen.

De landmark publicatie waar de 5.1 lid2h naar verwijst is een interessante en relevante publicatie in de huidige maatschappelijk context. Echter gaat het in dit project niet om een toxicologisch onderzoek, maar om een farmacologisch onderzoek, waardoor het voorstel hier dus niet van toepassing is.

Algemene redactionele vragen/opmerkingen:

Reactie: onderstaande opmerkingen van de 5.1 lid2h zijn verwerkt in de bijgevoegde documenten.

- De titel van pv en nts lijken niet in overeenstemming. De titel van de NTS mist bovendien een lidwoord.
- Start datum project niet realistisch

Strategie

- Figuur 2 beschrijft dat u 17 stoffen in vitro gaat analyseren, terwijl in de tekst minimaal 15. Waarom hier exact 17? Graag in overeenkomst brengen.

Appendix 1.

- De 5.1 lid2h stelt voor om de proefopzet schematisch weer te geven (m.n. tijdlijn).

-Het lijkt erop dat het doel van de pilot studies (training - adrenaline) niet in overeenkomst is met Figuur 2 PV (acetylcholine/kalium/tyramine).

A.Experimetele aanpak - U noemt 60 dieren in de laatste zin van deze sectie terwijl verderop sprake is van 80 dieren + 20 pilot dieren, dit lijkt niet correct?

F.Classificatie van ongerief. -Het lijkt de DEC niet juist om het niet gebruiken van verdoving bij het doden als een vorm van verfijning te presenteren.

K. Bestemming van de dieren

- Beter ook hier de optie van cervicale dislocatie verwijderen (is geen reële optie).



Formulier

Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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 2.1 aangekruiste categorieën.

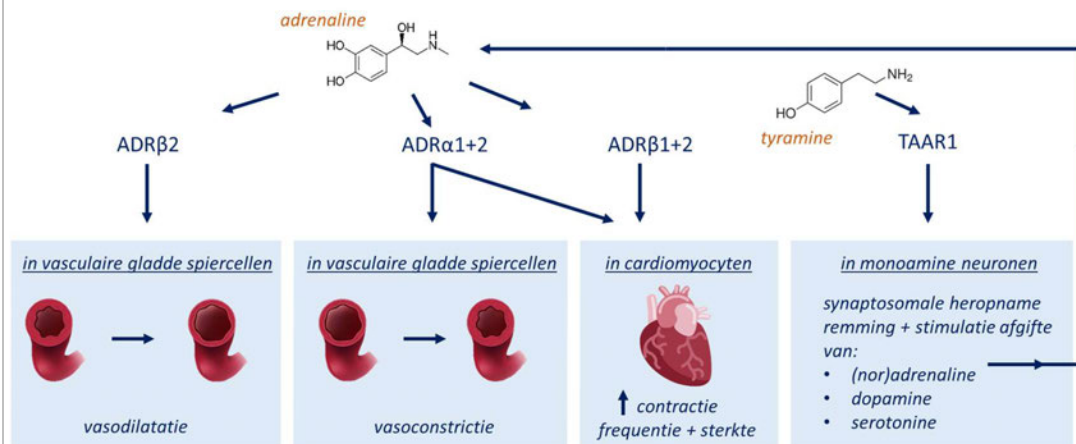
Aanleiding

Op de Nederlandse markt zijn verschillende voedingssupplementen verkrijgbaar die gericht zijn op sportprestatiebevordering. Deze supplementen bevatten vaak farmacologisch actieve stoffen om zo deze beloofde eigenschappen te kunnen bewerkstelligen. Recentelijk heeft de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) 416 voedingssupplementen onderzocht, waarbij in 64% van de supplementen één of meerdere farmacologisch actieve stoffen zijn gevonden, waaronder planttoxines, geneesmiddelen en gemodificeerde analogen hiervan ¹. De

aanwezigheid van deze stoffen was niet altijd vermeld op de verpakking. Ook waren concentraties van deze stoffen niet altijd te achterhalen of weken de gemeten concentraties af van de productspecificatie. Bijvoorbeeld, de maximale gemeten dosis voor de actieve stof 1,3-dimethylamylamine (DMAA) was 143 mg. Dit is ongeveer 35 keer meer dan de aanbevolen maximale dagelijkse veilige dosis van 4 mg ^{1,2}. Dit brengt mogelijk gezondheidsrisico's met zich mee, aangezien voor veel gedetecteerde stoffen geen farmacologische gegevens beschikbaar zijn.

Achtergrond

Het grootste gedeelte van de door de NVWA aangetroffen farmacologisch actieve stoffen hebben een vergelijkbare moleculaire structuur als de "trace amines" en catecholamines. Zo zijn er amfetamine- en synefrine-achtige stoffen aangetroffen (bijv. fenethylamine, methylsynefrine, beta-methylfenethylamine (BMPEA), dimethylfenethylamine (DMPEA)). Van amfetamine en synefrine is bekend dat zij sympathomimetische effecten vertonen, wat inhoudt dat ze de effecten van endogene agonisten, zoals (nor)adrenaline en dopamine, op het sympathische zenuwstelsel nabootsten. Directe effecten zijn de activatie van α - en β -adrenerge receptoren. Indirect kunnen deze stoffen de heropname van endogene agonisten (catecholamines) beïnvloeden door te binden aan trace amine geassocieerde receptoren (bijv. TAAR1). Deze effecten kunnen leiden tot een sympathische activatie van hart en bloedvaten, waardoor verhoging van bloeddruk en hartslag kan plaatsvinden (zie Figuur 1). Het scala aan farmacologisch actieve stoffen in de supplementen is echter veel groter, waarbij door de jaren steeds meer nieuwe stoffen (die vaak kleine chemische modificaties van reeds bekende en gereguleerde of verboden stoffen bevatten) worden gedetecteerd ^{1,3,4}. Voor veel van deze stoffen zijn farmacologische gegevens en werkingsmechanismes onbekend.



Figuur 1 – Versimpeld schematisch overzicht van directe en indirecte sympathomimetische effecten gereguleerd door adrenerge receptor $\alpha 1$ ($ADRA1$), $\alpha 2$ ($ADRA2$), $\beta 1$ ($ADR\beta 1$), $\beta 2$ ($ADR\beta 2$) en trace amine geassocieerde receptor 1 ($TAAR1$).

Ondanks het feit dat farmacologische informatie ontbreekt, worden de supplementen toch op grote schaal gebruikt ⁵. Uit een recentelijk gepubliceerd onderzoek van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) blijkt dat ruim een kwart van de amateursporters voor of na het sporten één of meerdere sportsupplementen neemt ⁵. Meer dan de helft van de gebruikers die deelnamen aan dit onderzoek gaf aan bijwerkingen zoals hoofdpijn, slaperigheid en hartkloppingen te ervaren. Verschillende casussen laten zien dat het gebruik van deze voedingssupplementen gepaard kan gaan met ernstige gezondheidsklachten. Zeijlon et al. (2022) hebben in een systematische reviewstudie gekeken naar casussen die het gebruik van sportvoedingssupplementen en ernstige gezondheidsklachten rapporteerden ⁶. Zij hebben 72

casussen bestudeerd waarin het gebruik van 134 verschillende sportvoedingssupplementen gepaard ging met 37 verschillende negatieve gezondheidsklachten. De meest gerapporteerde ernstige gezondheidsklachten waren onder andere acuut myocardiaal infarct, hartstilstand en hersenbloeding. Vanwege een gebrek aan gegevens is het momenteel niet mogelijk om de risico's en incidenten in cijfers uit te drukken voor de gehele samenleving ⁵.

Deze casussen laten zien dat consumptie van voedingssupplementen gericht op bevordering van sportprestaties gepaard kan gaan met zeer ernstige bijwerkingen. In veel gevallen maken de voedingswaren- en geneesmiddelenwetgeving het niet mogelijk om te handhaven ¹. Dit komt doordat er voor veel van deze stoffen geen **farmacologische gegevens** beschikbaar zijn. Dit is een ongewenste situatie, omdat hierdoor producten die farmacologisch actieve stoffen bevatten op de markt blijven. Om deze producten van de markt te halen vereist de huidige wetgeving om wetenschappelijk aan te tonen dat producten onveilig zijn. Daarom is het van groot belang om onderzoek te verrichten naar de farmacologische effecten en mechanismen van deze stoffen om zo de handhaving op deze producten te stimuleren. **De NVWA is dan ook een academische partner in dit project.**

Cardiovasculaire regulatie door het sympathisch zenuwstelsel

Het sympathisch zenuwstelsel reguleert het cardiovasculair systeem door het veranderen van de perifere vasculaire weerstand, sterkte en frequentie van de hartcontractie en de vasculaire tonus ⁷. Een aantal receptoren speelt hierbij een sleutelrol. Bij directe sympathische activatie wordt in dit project gefocust op de adrenerge receptoren ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$) en de betrokken werkingsmechanismen. Endogene agonisten van deze receptoren zijn de catacholamines adrenaline en noradrenaline. Indirecte sympathische activatie wordt bestudeerd door de effecten van de farmacologisch actieve stoffen op TAAR1 en bijbehorende mechanismen te onderzoeken. Hierna wordt kort beschreven wat de rol van deze receptoren is bij sympathische regulatie en waar deze receptoren tot expressie komen. Een versimpeld schematisch overzicht is weergegeven in Figuur 1.

- $\alpha 1$ adrenerge receptoren (activatie sympathisch zenuwstel) komen met name tot expressie in vasculaire gladde spiercellen waar activatie zorgt voor verhoogde vasoconstrictie. In het hart leidt activatie tot een toename in contractiesterkte (inotropie).
- $\alpha 2$ adrenerge receptoren (activatie sympathisch zenuwstel) komen ook voor in vasculaire gladde spiercellen, maar in kleinere hoeveelheden dan $\alpha 1$. Activatie leidt tot vasoconstrictie. Daarnaast is deze receptor onder andere gelokaliseerd in vetcellen waar het de lipolyse remt.
- $\beta 1$ adrenerge receptoren (activatie sympathisch zenuwstel) komen het meest tot expressie in het hart waar het zorgt voor chronotrope (toename hartslagsnelheid) en inotrope effecten (toename hartslagsterkte).
- $\beta 2$ adrenerge receptoren (activatie sympathisch zenuwstel) komen onder andere tot expressie in vasculaire gladde spiercellen waar activatie zorgt voor vasodilatatie ⁷.
- Trace amine geassocieerde receptor 1 (TAAR1) komt vooral intracellulair tot expressie in verschillende monoaminerge breingebieden, waaronder in dopaminerge cellen in de substantia nigra, de nucleus accumbens en de nucleus caudatus ⁸⁻¹⁰. Wanneer TAAR1 samen met dopamine-, noradrenaline- of serotoninetransporters is gelokaliseerd, remt TAAR1 activatie de heropname van deze stoffen in de betreffende neuronen (dopamine, noradrenaline en serotonine) door deze transporters te internaliseren. Ook stimuleert het de afgifte van deze neurotransmitters. Hierdoor is de concentratie van deze neurotransmitters in de synaptische spleet gedurende langere tijd verhoogd. Dit leidt onder andere tot indirecte activatie van het sympathisch zenuwstelsel. Zo is dopamine een precursor van noradrenaline en adrenaline, die de eerdergenoemde adrenerge receptoren kunnen activeren ¹¹.

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Directe doel

Het directe doel van dit project is om de effecten van "trace-amine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op het sympathisch zenuwstelsel te bestuderen om zo bij te dragen aan de risicobeoordeling en stimulatie van handhaving van deze stoffen. Dit doel zal behaald worden door het voltooien van de volgende subdoelen.

Subdoelen

Directe sympathomimetische effecten van catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen:

- op bloeddruk, hartslagfrequentie en hartslagcontractiekracht *in vivo* in de rat.
- op vaatcontractiliteit bestuderen (*ex vivo*) in mesenteriale weerstandsvaten van de rat.

Indirecte sympathomimetische effecten van "trace-amine"-achtige stoffen in voedingssupplementen:

- op bloeddruk, hartslagfrequentie en hartslagcontractiekracht *in vivo* in de rat bestuderen.
- op TAAR1 expressie in synaptosomen geïsoleerd uit rat hersenen bestuderen.
- op dopamine-, noradrenaline- en serotonine transport bestuderen in synaptosomen geïsoleerd uit rat hersenen.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

Binnen **5.1 lid2h** is er ruime ervaring met het opzetten van *in vivo* dierstudies en myograafstudies met ratten. Deze kennis ligt met name bij de senior onderzoekers. Het is daarom erg belangrijk om deze kennis over te dragen naar de junior onderzoekers. Daarom zullen er pilotstudies uitgevoerd worden om de kennis van de technieken aan deze onderzoekers over te dragen. De onderzoekers zullen opgeleid worden voor de volgende handelingen: (1) het plaatsen van de telemetrieapparatuur in de dieren, (2) het aanbrengen van permanente canules, (3) isolaties van mesenteriale vaten en hersenweefsel, (4) het plaatsen van mesenteriale vaten in een functionerende myograafopstelling en (5) optimalisatie van het bereidingsprotocol voor synaptosomen. De vakgroep heeft de kennis in huis om deze junior onderzoekers op te leiden voor de bovenstaande technieken.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Dit project heeft zowel een maatschappelijk als een wetenschappelijk belang. Het onderzoek van Biesterbos *et al.* (2019) laat zien dat voedingssupplementen gericht op de bevordering van sportprestaties een verscheidenheid aan farmacologisch actieve stoffen kunnen bevatten

waarvan onderzoek naar de veiligheid en werkingsmechanismes ontbreekt¹. Meerdere casussen laten zien dat het gebruik van deze voedingssupplementen aanleiding kunnen geven tot ernstige gezondheidsschade zoals een hersenbloeding of een acuut hartinfarct ⁴²⁻⁴⁴. Het is van belang voor de maatschappij dat er onderzoek wordt verricht naar de sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen om enerzijds consumenten beter te kunnen informeren om zo ernstige gezondheidsschade zoals deze te voorkomen en anderzijds om de veiligheidsautoriteiten te ondersteunen bij het uitvoeren van risicobeoordelingen waardoor er gehandhaafd kan worden.

Daarnaast heeft dit project een wetenschappelijk belang. Dit project zal bijdragen aan de kennisontwikkeling van de werkingsmechanismen van de te onderzoeken stoffen en de translatie van deze mechanismen naar fysiologisch relevante effecten. De lijst met farmacologische actieve stoffen die in voedingssupplementen worden gedetecteerd groeit snel. Dit kan verklaard worden doordat voedingssupplement producenten steeds weer nieuwe stoffen ontwikkelen voor gebruik in hun supplementen, doordat zij kleine chemische aanpassingen doen aan bestaande farmacologisch actieve stoffen waardoor er een nieuwe stof ontstaat en de bestaande regulering wordt omzeild. De te onderzoeken stoffen hebben daarom vergelijkbare moleculaire structuren. Deze chemische modificaties kunnen de effecten op het sympathisch zenuwstelsel veranderen en daarom zullen deze gemodificeerde stoffen uitvoerig worden bestudeerd.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

Belanghebbenden in dit project zijn gebruikers van voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering, wetenschappers die in hetzelfde onderzoeksveld werkzaam zijn en overheidsinstanties (zoals de NVWA). In dit project zullen de effecten van farmacologisch actieve stoffen in deze supplementen op het sympathisch zenuwstelsel bestudeerd worden. Dit zal een bijdrage leveren aan de risicobeoordeling van deze supplementen, waarbij de NVWA kan handhaven indien deze supplementen onveilig bevonden worden. Daardoor is de NVWA ook een belanghebbende partij in dit project. De proefdieren hebben weliswaar geen belang bij de uitkomsten van het onderzoek, maar ondergaan wel de effecten van de uitvoering ervan. Daarom is een experimentele aanpak gekozen waarbij de negatieve gevolgen van de experimenten zo beperkt mogelijk gehouden worden. De dieren worden opgeofferd in het kader van het wetenschappelijke en maatschappelijke belang. De resultaten van de studies waarvan de dieren onderdeel van zijn, vormen een fundament om de NVWA handvaten te geven om onveilig bevonden stoffen van de markt te halen.

3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

In Figuur 2 (blz. 9) is de fasering samengevat en schematisch weergegeven. De pijlen geven de volgorde aan waarin de verschillende studies zullen plaatsvinden. Eerst wordt er een literatuurstudie gedaan (1), gevolgd door *in vitro* studies (2). Op basis van de uitkomsten van deze *in vitro* studies wordt een selectie van maximaal 10 stoffen gemaakt om *in vivo* en *ex vivo* te bestuderen (3.1 en 3.2). Hierna worden de verschillende onderdelen van de projectfasering in meer detail beschreven.

Projectfasering

Literatuurstudie

In de eerste fase van dit project is middels een literatuurstudie een overzicht gemaakt van gedetecteerde stoffen in deze voedingssupplementen. Vervolgens zijn stoffen ingedeeld in stofklassen op basis van hun molecuulstructuur. De stoffen uit stofklassen die sympathomimetische effecten vertonen, zoals de fenethylamines en de alkylamines, zijn geselecteerd voor een uitgebreider literatuuronderzoek naar de werkingsmechanismen, toxicokinetiek en toxicodynamiek van deze stoffen.

In vitro studies

Op basis van het overzicht van de gedetecteerde stoffen en de beschikbare farmacologische gegevens zal vervolgens een selectie van stoffen, waarvan weinig tot niets bekend is over werkingsmechanismen, *in vitro* onderzocht worden. Deze studies zullen voornamelijk gericht zijn op het bepalen van de affiniteit en potenties van de geselecteerde stoffen voor het binden aan en activeren van de α 1-, α 2-, β 1- en β 2- adrenerge receptoren en TAAR1. Dit zijn de voornaamste receptoren die een belangrijke rol spelen bij de cardiovasculaire (bij)werkingen van de farmacologisch actieve stoffen in de supplementen. Concentratie-response relaties van deze stoffen voor receptoren die tot activatie van het sympathisch zenuwstelsel leiden, worden onderzocht met getransfecteerde cellijnen die deze receptoren tot overexpressie brengen. Ook wordt transport van de geselecteerde stoffen over een monolayer van darmcellen (Caco-2 cellijn) gemeten in een transwell systeem. Deze resultaten worden gebruikt om passage over de bloed-hersen-barrière te voorspellen ¹².

Prioritering

De bovenstaande *in vitro* studies worden gebruikt om stoffen te prioriteren. De potentie en effectiviteit waarmee ze de betreffende receptoren activeren, worden gebruikt als voorspeller van hun sympathomimetische effecten in mensen. In de literatuur zijn meer dan 90 verschillende farmacologisch actieve stoffen gerapporteerd in voedingssupplementen gericht op bevordering van sportprestaties (zie Tabel 2, op p. 14-16 van dit document). Voor de *in vitro* studies zullen hiervan minimaal 16 stoffen bestudeerd worden. Deze selectie is gekozen op basis van de vergelijkbare molecuulstructuur als reeds bekende en goed gekarakteriseerde catecholamines (zoals adrenaline, noradrenaline en dopamine) en trace amines (zoals amfetamine) en waarvan nog geen informatie bekend is over hun werkingsmechanisme. Op basis van de molecuulstructuur van deze stoffen wordt verwacht dat zij vergelijkbare effecten als de bovenstaande (endogene) stoffen kunnen vertonen. Het gaat hierbij om directe sympathomimetische effecten, zoals nabootsing van catecholamines die de adrenerge receptoren activeren. Daarnaast gaat het om indirecte sympathomimetische effecten, zoals nabootsing van de trace amines die via TAAR1 de heropname en afgifte van de catecholamines kunnen beïnvloeden. Stoffen die tot nu toe tot deze selectie behoren zijn stoffen uit de klassen van fenethylamines en de alkylamines (zie Tabel 1).

Tabel 1 – Selectie van trace amine- en catecholamine-achtige stoffen gedetecteerd in voedingssupplementen

Stof gedetecteerd in voedingssupplement	Stofklasse	Referenties
1,3-Dimethylamylamine (DMAA)	alkylamine	1,3,16-21
1,3-Dimethylbutylamine (DMBA)	alkylamine	1,3,17,18,21
2-Amino-6-methylheptane (DMHA)	alkylamine	3,17
Dimethylaminoethanol (DMAE)	alkylamine	1,18
β -Methylfenethylamine (BMPEA)	fenethylamine	1,3,18,21-23

Halostachine	fenethylamine	1
Higenamine	fenethylamine	1,3,18,21,24
Hordeanine	fenethylamine	1,18,22,25
Isopropylornosyefrine	fenethylamine	1,3,4,20,22,26
Methylsynefrine	fenethylamine	1,3,4,18,21,22,26,27
N,N-Dimethylfenethylamine (N,N-DMPEA)	fenethylamine	18
N-methyltyramine	fenethylamine	18,22,26
Octopamine	fenethylamine	1,22,26
Fenethylamine (PEA)	fenethylamine	1,18,22,23,28
Synefrine	fenethylamine	1,4,18-20,22,26,27,29
Tyramine	fenethylamine	26

In vivo en ex vivo studies

Op basis van de uitgevoerde *in vitro* studies, zullen vervolgens de meest potente en effectieve stoffen worden geselecteerd om verder te onderzoeken in *in vivo* en *ex vivo* studies. Dit wordt bepaald door te kijken naar de concentratie van de stoffen waarbij een effect van 50% van het maximale effect behaald wordt (EC₅₀ waarde). Daarnaast wordt er gekeken naar het maximale effect dat een stof kan geven ten opzichte van het maximale effect van een positieve controle, zoals adrenaline. Dit is de E_{max} waarde. Teststoffen met een *in vitro* EC₅₀ kleiner dan 10 µM en een E_{max} waarde groter dan 70% worden geselecteerd om te onderzoeken in een *in vivo* en twee *ex vivo* diermodellen. Deze modellen worden gebruikt met als doel om de translatie van fundamentele werkingsmechanismen naar fysiologisch relevante functionele effecten te maken. De *in vivo* en *ex vivo* modellen dienen hier dus als fysiologisch relevantere modellen dan de voorafgaande celmodellen waarmee de effecten van receptoractivatie (α1, α2, β1, β2, TAAR1) op orgaanfunctie bestudeerd worden. De sympathomimetische effecten van de geselecteerde stoffen worden in drie modellen bestudeerd: (1) *in vivo* cardiovasculaire effecten, (2) *ex vivo* effecten op bloedvatvernauwing en/of -verwijding in mesenteriale weerstandsvaten en (3) *ex vivo* centrale effecten op de afgifte en heropname van trace amines in synaptosomen uit de hersenen. De drie modellen worden naast elkaar gebruikt. Er zijn geen selectiemomenten tussen de drie modellen

(1) In vivo: cardiovasculaire effecten

Om de effecten van activatie van adrenerge receptoren en TAAR1 op het cardiovasculaire systeem te bestuderen, worden volwassen Wistar Kyoto (WKY) ratten intraveneus blootgesteld aan de teststoffen (met 8 toenemende dosering). Er wordt gebruik gemaakt van een farmacologisch relevante dosering, geschat op basis van plasmawaarden van vergelijkbare stoffen en gemeten plasmawaarden voor een aantal van deze stoffen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van toenemende doseringen in half-logaritmische stappen. Hogere doseringen worden toegediend indien na het induceren van een effect een plateau is bereikt. Dit wordt voor de opvolgende, toenemende, doseringen herhaald, om uiteindelijk een ED₅₀ waarde te kunnen vaststellen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke ratten, om zo de gebruikersgroep van deze voedingssupplementen in de samenleving het best te weerspiegelen³⁰. Met draadloze telemetriezendes worden cardiovasculaire effecten, zoals bloeddruk, hartslagfrequentie en inotropie waargenomen. Dieren zullen aan maximaal 5 stoffen worden blootgesteld met een wash-out periode na iedere stof. Het aantal stoffen is inclusief de controlestof adrenaline die een week voor toediening van de eerste teststof wordt toegediend en een week voor de opoffering. Er worden dus maximaal 4 teststoffen toegediend en twee keer controlestof adrenaline (in toenemende doseringen met half-logaritmische stappen). Er wordt ernaar gestreefd om dieren zoveel als mogelijk her te gebruiken (met een maximum van 5 stoffen per dier, gebaseerd op de geschatte maximale houdbaarheid van de i.v. canule waarmee stoffen worden toegediend). Tussen de toediening van de toenemende doseringen (een vehicle

+ 8 doseringen) van een stof vindt geen wash-out plaats. Hoewel de klaringssnelheid van de meeste stoffen onbekend is, is er voor de bepaling van de wash-outperiode gekeken naar gegevens van de vergelijkbare stof methamfetamine. De halfwaardetijd van methamfetamine is ongeveer 70 minuten in ratten na iv-toediening ³¹. Deze stof zal na ongeveer 280 minuten helemaal geklaard zijn (70 maal omrekeningsfactor 4 = 280 minuten). Om er zeker van te zijn dat metabolieten ook geklaard zijn en om de dieren ruim tijd te geven om te herstellen van mogelijke effecten, is er gekozen voor een ruime wash-out periode van minimaal 1 week. Ook vanuit praktisch oogpunt geeft dit de onderzoekers voldoende tijd om alle studies goed te kunnen uitvoeren en voor te bereiden.

Na de laatste wash-out periode worden de dieren opgeofferd middels decapitatie. De keuze gaat uit naar deze dodingsmethode, omdat deze methode minimale effecten heeft op het hersenweefsel dat gebruikt wordt voor de latere *ex vivo* studies. Er zal geen anestheticum in de hersenen achterblijven en er zal geen beschadiging optreden aan de hersenstam (in tegenstelling tot een overdosis anesthesie) ^{32,33}. Dit is van groot belang voor de kwaliteit van de synaptosomen. Daarnaast kunnen andere methoden, zoals een overdosis anesthesie en CO₂ inhalatie, de vaatfunctie beïnvloeden, wat niet wenselijk is voor de latere *ex vivo* vaatstudies ³⁴. In de literatuur staat, tot zover bekend, niet beschreven of decapitatie de vasculaire functie beïnvloedt. Echter, de voordelen van deze dodingsmethode voor de kwaliteit van het hersenweefsel zijn groter dan de eventuele nadelige effecten op de vaten. Daarnaast worden alle dieren op dezelfde manier gedood, inclusief de controles, waardoor correctie voor eventuele effecten is ingebouwd in de studie.

(2) Ex vivo: mesenteriale vaten

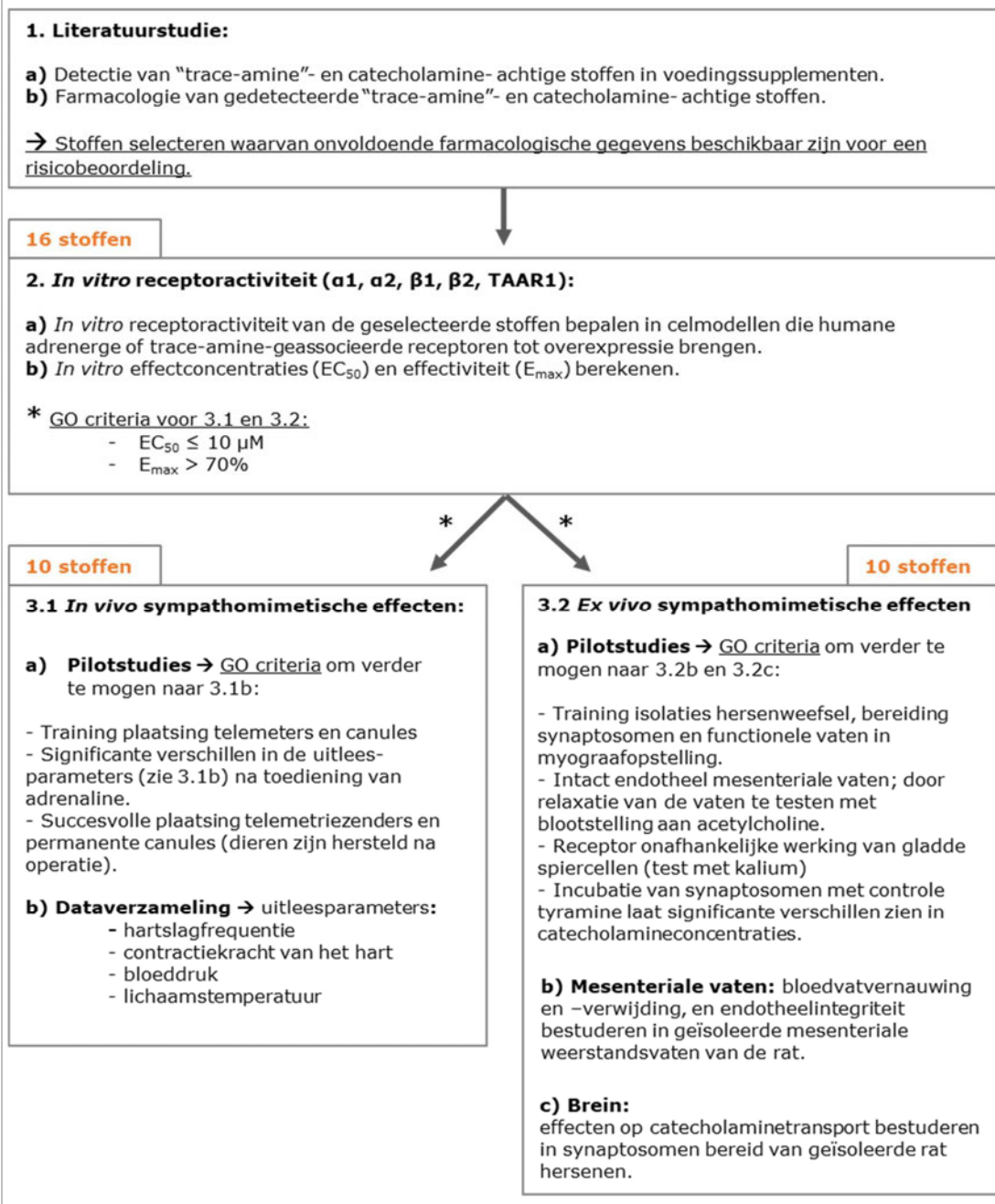
Directe sympathomimetische effecten op de adrenerge receptoren worden verder bestudeerd in mesenteriale weerstandsvaten van de rat. Met dit model kan van eerder vastgestelde *in vivo* α -effecten vastgesteld worden of deze enkel perifeer gereguleerd zijn of ook centraal. Indien *in vivo* α -effecten centraal gereguleerd zijn, zullen deze effecten in dit *ex vivo* model niet zichtbaar zijn. De weerstandsvaten spelen een belangrijke rol bij de bloeddrukregulatie. De gladde spiercellen in deze vaten bevatten zowel α_1 - als α_2 -adrenerge receptoren, die vasoconstrictie reguleren. Meerdere studies laten zien dat dit model geschikt is om zowel α_1 - als α_2 - adrenerge receptor gemedieerde vasoconstrictie te bestuderen (zoals Wong et al. 2010; Vrolijk et al. 2015; Hao et al. 2006; Kapsokalyvas et al. 2014 ³⁵⁻³⁸). Naast vasoconstrictie worden effecten van de geselecteerde stoffen op vaatdilatatie bestudeerd door effecten te vergelijken met goed bestudeerde specifieke β_2 agonisten, zoals salbutamol ³⁹. Om receptor gemedieerde effecten te bevestigen zullen effecten van teststoffen ook in combinatie met selectieve antagonisten onderzocht worden. De effecten van de geselecteerde stoffen op vasculaire tonus (contractie en dilatatie), endotheel- en gladde spiercelintegriteit van de geïsoleerde mesenteriale weerstandsvaten worden onderzocht met een *small vessel* myograaf, waarbij resultaten worden vergeleken met goed bestudeerde stoffen zoals adrenaline en efedrine ⁴⁰. Hierbij zullen concentratie-response relaties (EC₅₀) en maximale effecten (E_{max}) bepaald worden.

(3) Ex vivo: brein

Indirecte sympathomimetische effecten van de geselecteerde stoffen worden bestudeerd in synaptosomale incubaties. Na opoffering van de rat worden delen van de hersenen geïsoleerd voor de bereiding van een homogenaat, waarmee de effecten van de geselecteerde stoffen op TAAR1-gemedieerd dopamine-, noradrenaline- en serotoninetransport bestudeerd kunnen worden. Schindler et al. (2021) laten zien dat voor dopamine transport assays hersenweefsel uit de Nucleus caudatus gebruikt kan worden en voor noradrenaline en serotonine transport het gehele brein zonder het cerebellum en caudaat weefsel ⁴¹. In de assays zullen de effecten van de teststoffen bestudeerd worden op de fosforylatie van dopamine-, noradrenaline- en serotoninetransporters (met behulp van Westernblot). Ook worden de effecten van de teststoffen op (her)opname van dopamine, noradrenaline en serotonine via bovengenoemde transporters bestudeerd door release van deze endogene stoffen met massaspectrometrie te kwantificeren.

Pilotstudies

Voordat er overgegaan kan worden op dataverzameling van de *in vivo* (3.1) en *ex vivo* (3.2) studies is het van belang eerst pilotstudies uit te voeren. Deze pilotstudies zijn nodig om de onderzoekers op te leiden voor een aantal experimentele handelingen: (1) het plaatsen van de telemetrieapparatuur in de dieren, (2) het aanbrengen van permanente canules, (3) isolaties van mesenteriale vaten en hersenweefsel, (4) het plaatsen van mesenteriale vaten in een functionerende myograafopstelling en (5) optimalisatie van het bereidingsprotocol voor synaptosomen.



Figuur 2 – Samenvatting en schematische weergave van de projectfasering

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Er wordt in deze strategie gestart met een literatuurstudie, om een overzicht van de gedetecteerde farmacologisch actieve stoffen te krijgen. Er is gekozen voor de selectie van de 17 stoffen die verder *in vitro* onderzocht worden, omdat dit stoffen zijn waarvan de NVWA onvoldoende gegevens heeft om een risicobeoordeling uit te voeren en omdat dit potentiële sympathomimetische stoffen zijn vanwege hun vergelijkbare molecuulstructuur met endogene catecholamines en trace amines. Omdat het aantal gevonden (potentieel) actieve stoffen in voedingssupplementen groot is, is het niet haalbaar alle stoffen in de *in vitro* en in de dierstudies te onderzoeken. De opbouw van de strategie zorgt voor een prioritering, waarbij in de literatuurstudie wordt gekeken om een selectie van de meest maatschappelijk relevante stoffen te selecteren. Onder maatschappelijk relevante stoffen worden stoffen verstaan die (a) (*in vitro*) biologisch actief zijn en (b) die (legaal) op de markt beschikbaar zijn. Dit kan samen zorgen voor maatschappelijke implicaties. Criteria voor de stoffeselectie voor de *in vivo* studie zijn *in vitro* EC50 waardes kleiner dan 10 μM en *in vitro* E_{max} waardes groter dan 70%. De beschikbaarheid van de stoffen staat beschreven in de studie van Biesterbos et al. (2019), waarin een hele reeks aan stoffen zijn gepresenteerd, die (chemisch analytisch) gedetecteerd zijn in voedingssupplementen.

De resultaten van de *in vitro* studies geven een beeld van welke stoffen mogelijk *in vivo/ex vivo* effecten kunnen laten zien. Dit is dus een non-invasieve manier om snel en gericht resultaten te krijgen. De *in vitro* studies zorgen ervoor dat er een prioritering plaatsvindt op basis van potentie en effectiviteit om uiteindelijk *in vivo* en *ex vivo* significante effecten te kunnen waarnemen. Stoffen die *in vitro* geen of minimale effecten laten zien, zullen naar verwachting ook geen significante effecten in de *in vivo/ex vivo* studies laten zien. Deze strategie is dus een zo efficiënt mogelijke aanpak om de NVWA van onderzoeksresultaten te voorzien die nodig zijn voor de handhaving en regulatie van deze stoffen in voedingssupplementen. Ook zorgen de verschillende selectiemomenten ervoor dat dit een goede strategie is om (A) niet onnodig stoffen in dieren te testen en zo het aantal benodigde dieren voor dit project te verminderen en (B) om gericht potentieel gevaarlijke stoffen van de markt te verwijderen.

Er is gekozen voor de rat als *in vivo/ex vivo* model, omdat het cardiovasculair systeem van de rat vergelijkbaar is met dat van de mens⁵⁶. De keuze gaat uit naar intraveneuze blootstelling in de *in vivo* studies om invloed van de biologische beschikbaarheid uit te sluiten⁵⁷. De reden om de dieren intraveneus bloot te stellen is om dosis-respons relaties te onderzoeken om zo de *in vivo* potentie van de teststoffen te bepalen. Dit is niet mogelijk wanneer teststoffen oraal toegediend worden.

Om relevante concentraties toe te dienen in de dierproef wordt gekeken naar gerapporteerde plasmaconcentraties in de mens. Van een aantal stoffen zijn plasmaconcentraties in mensen gemeten na een orale toediening. Voor methylsinefrine is bijvoorbeeld een maximale plasmaconcentratie van 678 nM gemeten na een orale inname van 64 mg⁵⁸. Van de stof DMAA zijn maximale plasmawaarden in een mens gemeten van 668 nM na orale inname van 25 mg⁵⁹. Op basis van deze plasmawaarden kan een concentratierange geselecteerd worden voor de dierstudie, zodat er fysiologisch relevante concentraties getest worden. Dit is echter niet mogelijk voor alle geselecteerde stoffen door een gebrek aan gegevens in de literatuur. Hiervoor zal daarom een schatting op basis van de overeenkomsten in chemische structuur, opnamedata van *in vitro* studies met Caco-2 cellen en de potentiewaarden uit *in vitro* receptor assays gebruikt worden om een range aan doseringen te kiezen.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen

Referenties

1. Biesterbos, J. W. H., Sijm, D. T. H. M., van Dam, R. & Mol, H. G. J. A health risk for consumers: the presence of adulterated food supplements in the Netherlands. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **36**, 1273–1288 (2019).
2. Venhuis, B. J. & de Kaste, D. *Scientific Opinion on the Regulatory Status of 1,3-Dimethylamylamine (DMAA)*. www.sciencedomain.org.
3. Cohen, P. A., Travis, J. C., Vanhee, C., Ohana, D. & Venhuis, B. J. Nine prohibited stimulants found in sports and weight loss supplements: deterenol, phenpromethamine (Vonedrine), oxilofrine, octodrine, beta-methylphenylethylamine (BMPEA), 1,3-dimethylamylamine (1,3-DMAA), 1,4-dimethylamylamine (1,4-DMAA), 1,3-dimethylbutylamine (1,3-DMBA) and higenamine. *Clinical Toxicology* (2021) doi:10.1080/15563650.2021.1894333.
4. Venhuis, B., Keizers, P., van Riel, A. & de Kaste, D. A cocktail of synthetic stimulants found in a dietary supplement associated with serious adverse events. *Drug Testing and Analysis* **6**, 578–581 (2014).
5. Razenberg, L., Notenboom, S. & de Wit-Bos, L. Het gebruik van workout-supplementen door sporters in Nederland. *RIVM-rapport 0116*, (2021).
6. Zeijlon, R., Hantelius, V., Wallerstedt, S. M. & Holmqvist, L. Sports nutrition supplements and adverse events – a meta-epidemiological study of case reports specifically addressing causality assessment. *European Journal of Clinical Pharmacology* vol. 78 (2022).
7. Katzung, B. G. *Basic & Clinical Pharmacology*. <http://www.usdoj.gov/dea/pubs/scheduling.html>.
8. Pei, Y., Asif-Malik, A. & Canales, J. J. Trace amines and the trace amine-associated receptor 1: Pharmacology, neurochemistry, and clinical implications. *Frontiers in Neuroscience* **10**, 148 (2016).
9. Rutigliano, G., Accorroni, A. & Zucchi, R. The Case for TAAR1 as a Modulator of Central Nervous System Function. *Frontiers in Pharmacology* **8**, (2017).
10. Xie, Z. *et al.* Rhesus monkey trace amine-associated receptor 1 signaling: enhancement by monoamine transporters and attenuation by the D2 autoreceptor in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **321**, 116–127 (2007).
11. Juárez Olguín, H., Calderón Guzmán, D., Hernández García, E. & Barragán Mejía, G. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, (2016).
12. Cyprotex. Caco-2 Permeability Assay. <https://www.cyprotex.com/admepk/in-vitro-permeability-and-drug-transporters/caco-2-permeability/>.
13. Riedel, M. *et al.* Functional and Pharmacological Analysis of Cardiomyocytes Differentiated from Human Peripheral Blood Mononuclear-Derived Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **3**, 131 (2014).
14. Sirenko, O. *et al.* Multiparameter in vitro assessment of compound effects on cardiomyocyte physiology using iPSC cells. *Journal of Biomolecular Screening* **18**, 39–53 (2013).
15. Sharma, A. *et al.* Use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to assess drug cardiotoxicity. *Nature Protocols* **13**, 3018–3041 (2018).
16. Cohen, P. A., Travis, J. C. & Venhuis, B. J. A synthetic stimulant never tested in humans, 1,3-dimethylbutylamine (DMBA), is identified in multiple dietary supplements. *Drug Testing and Analysis* **7**, 83–87 (2015).
17. Cohen, P. A., Travis, J. C., Keizers, P. H. J., Deuster, P. & Venhuis, B. J. Four experimental stimulants found in sports and weight loss supplements: 2-amino-6-methylheptane (octodrine), 1,4-dimethylamylamine (1,4-DMAA), 1,3-dimethylamylamine (1,3-DMAA) and 1,3-dimethylbutylamine (1,3-DMBA). *Clinical Toxicology* **56**, 421–426 (2018).

18. Avula, B. *et al.* Liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometric method for targeted analysis of 111 nitrogen-based compounds in weight loss and ergogenic supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **174**, 305–323 (2019).
19. Hachem, R. *et al.* Proton NMR for detection, identification and quantification of adulterants in 160 herbal food supplements marketed for weight loss. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **124**, 34–47 (2016).
20. Bovee, T. F. H. *et al.* Dietary supplement for energy and reduced appetite containing the β -agonist isopropylxocetopamine leads to heart problems and hospitalisations. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2016.1167965> **33**, 749–759 (2016).
21. Duiven, E., van Loon, L. J. C., Spruijt, L., Koert, W. & de Hon, O. M. Undeclared doping substances are highly prevalent in commercial sports nutrition supplements. *Journal of Sports Science and Medicine* **20**, 328–338 (2021).
22. Zhao, J., Wang, M., Avula, B. & Khan, I. A. Detection and quantification of phenethylamines in sports dietary supplements by NMR approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **151**, 347–355 (2018).
23. Yun, J., Kwon, K., Choi, J. & Jo, C. H. Monitoring of the amphetamine-like substances in dietary supplements by LC-PDA and LC-MS/MS. *Food Science and Biotechnology* **26**, 1185–1190 (2017).
24. Cohen, P. A., Travis, J. C., Keizers, P. H. J., Boyer, F. E. & Venhuis, B. J. The stimulant higenamine in weight loss and sports supplements. *Clinical Toxicology* **57**, 125–130 (2019).
25. Pawar, R. S., Sagi, S. & Leontyev, D. Analysis of bitter orange dietary supplements for natural and synthetic phenethylamines by LC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis* **12**, 1241–1251 (2020).
26. Pawar, R. S., Sagi, S. & Leontyev, D. Analysis of bitter orange dietary supplements for natural and synthetic phenethylamines by LC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis* **12**, 1241–1251 (2020).
27. Vaysse, J. *et al.* Food Additives and Contaminants Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY 1 H-NMR. (2010) doi:10.1080/19440041003705821.
28. ElSohly, M. A. & Gul, W. LC-MS-MS Analysis of Dietary Supplements for N-ethyl- α -ethyl-phenethylamine (ETH), N, N-diethylphenethylamine and Phenethylamine. *Journal of Analytical Toxicology* **38**, 63–72 (2014).
29. Paíga, P. *et al.* Analysis of pharmaceutical adulterants in plant food supplements by UHPLC-MS/MS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **99**, 219–227 (2017).
30. Berg van den *et al.* 2018_RIVM_gebruik en veiligheid van doping en sportvoedingssupplementen.
31. Milesi-Hallé, A., Hendrickson, H. P., Laurenzana, E. M., Gentry, W. B. & Owens, S. M. Sex- and dose-dependency in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of (+)-methamphetamine and its metabolite (+)-amphetamine in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **209**, 203–213 (2005).
32. Cressey, D. Best way to kill lab animals sought. *Nature* **500**, 130–131 (2013).
33. Hawkins, P. *et al.* A Good Death? Report of the Second Newcastle Meeting on Laboratory Animal Euthanasia. *Animals 2016, Vol. 6, Page 50* **6**, 50 (2016).
34. Boivin, G. P., Hickman, D. L., Creamer-Hente, M. A., Pritchett-Corning, K. R. & Bratcher, N. A. Review of CO₂ as a Euthanasia Agent for Laboratory Rats and Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **56**, 491 (2017).
35. W Wong, E. S., K Man, R. Y., Vanhoutte, P. M., J Ng, K. F. & Ka Shing, L. Dexmedetomidine Induces Both Relaxations and Contractions, via Different 2-Adrenoceptor Subtypes, in the Isolated Mesenteric Artery and Aorta of the Rat. (2010) doi:10.1124/jpet.110.170688.
36. Vrolijk, M. F. *et al.* The supplement–drug interaction of quercetin with tamsulosin on vasorelaxation. *European Journal of Pharmacology* **746**, 132–137 (2015).
37. Hao, L., Nishimura, T., Wo, H. & Fernandez-Patron, C. Vascular responses to α 1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 819–825 (2006).
38. Kapsokalyvas, D. *et al.* Imaging evidence for endothelin ETA/ETB receptor heterodimers in isolated rat mesenteric resistance arteries. *Life Sciences* **111**, 36–41 (2014).
39. salbutamol (inhalatie).
https://www.farmacotherapeutischkompas.nl/bladeren/preparaatteksten/s/salbutamol__inhalatie_.
40. Zhang, M. *et al.* The cardiovascular side effects of Ma Huang due to its use in isolation in the Western world. *European Journal of Integrative Medicine* **18**, 18–22 (2018).
41. Schindler, C. W., Thorndike, E. B., Partilla, J. S., Rice, K. C. & Baumann, M. H. Amphetamine-like neurochemical and cardiovascular effects of α -ethylphenethylamine analogs found in dietary supplements. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **376**, 118–126 (2021).

42. Cohen, P. A., Zeijlon, R., Nardin, R., Keizers, P. H. J. & Venhuis, B. Hemorrhagic Stroke Probably Caused by Exercise Combined With a Sports Supplement Containing β -Methylphenyl-ethylamine (BMPEA): A Case Report. <https://doi.org/10.7326/L15-0106> **162**, 879–880 (2015).
43. Brandon Harris, C. F. Hemorrhagic Stroke in a Young Healthy Male Following Use of Pre-Workout Supplement Animal Rage XL. *MILITARY MEDICINE* **182**, 2030 (2017).
44. Smith, T. B., Staub, B. A., Natarajan, G. M., Lasorda, D. M. & Poornima, I. G. Acute myocardial infarction associated with dietary supplements: Containing 1,3-dimethylamylamine and citrus aurantium. *Texas Heart Institute Journal* **41**, 70–72 (2014).
45. Cianchino, V., Acosta, G., Ortega, C., Martínez, L. D. & Gomez, M. R. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. *Food Chemistry* **108**, 1075–1081 (2008).
46. Date, H. *et al.* [Rapid determination of medical components found in the health food for weight loss by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)]. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **128**, 811–817 (2008).
47. Wang, J., Chen, B. & Yao, S. Food Additives and Contaminants Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS. *Food Additives and Contaminants* **25**, 822–830 (2008).
48. Chen, Y. *et al.* Food Additives and Contaminants Determination of synthetic drugs used to adulterate botanical dietary supplements using QTRAP LC-MS/MS. (2009) doi:10.1080/02652030802641880.
49. Tseng, M.-C., Tsai, M.-J., Lin, J.-H. & Wen, K.-C. *GC/MS Analysis on Anorectics Adulterated in Traditional Chinese Medicines. Pages Journal of Food and Drug Analysis* vol. 8 (2000).
50. M, W., A, J., K, C., E, T.-L. & D, K. Determination of designer doping agent--2-ethylamino-1-phenylbutane--in dietary supplements and excretion study following single oral supplement dose. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **115**, 523–533 (2015).
51. Bogusz, M. J., Hassan, H., Al-Enazi, E., Ibrahim, Z. & Al-Tufail, M. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 554–564 (2006).
52. Wahlstrom, R. & Styles, C. Reliable identification and quantification of three diethylphenethylamines in a Dendrobium-based dietary supplement †. (2014) doi:10.1039/c4ay01452a.
53. van Hunsel, F., Venhuis, B. J., Keizers, P. H. J. & Kant, A. A "natural" weight loss product containing sibutramine. (2015) doi:10.1002/dta.1925.
54. Zou, P., Sze-Yin Oh, S., Kiagn, K.-H., Low, M.-Y. & Bloodworth, B. C. Detection of sibutramine, its two metabolites and one analogue in a herbal product for weight loss by liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 614–618 (2007).
55. Huang, Z., Xiao, S., Luo, D., Chen, B. & Yao, S. Simultaneous Determination of Sibutramine and N-Di-desmethylsibutramine in Dietary Supplements for Weight Control by HPLC-ESI-MS. *Journal of Chromatographic Science* **46**, 707–711 (2008).
56. Sanada, L. S., Tavares, M. R., Neubern, M. C. M., Salgado, H. C. & Fazan, V. P. S. Can Wistar rats be used as the normotensive controls for nerve morphometry investigations in spontaneously hypertensive rats (SHR)? *Acta Cirúrgica Brasileira* **26**, 514–520 (2011).
57. Cao, X., Gibbs, S.T., Fang, L., Miller, H.A., Landowski, C.P., Shin, H., Lennernas, H., Zhong, Y., Amidon, G.L., Yu, L.X., Sun, D. Why is it Challenging to Predict Intestinal Drug Absorption and Oral Bioavailability in Human Using Rat Model. *Pharmaceutical Research*, Vol. 23, No. 8, p. 1675 – 1686 (2006).
58. Verho, M., Malerczyk, V., Kauert, G., Lorenz, H. Dose linearity and relative bioavailability testing of oxilofrine, a sympathomimatic drug, in healthy volunteers. *International Journal of Pharmacology Research* 211-5, 8(3) (1988).
59. Schilling, B., Hammond, K., Bloomer, R., Presley, C., Yates, C. Physiological and pharmacokinetic effects of oral 1,3-dimethylamylamine administration in men. *BMC pharmacology and toxicology* **52**, 14 (2013).

Tabel 2 – Overzicht van farmacologisch actieve stoffen gedetecteerd in voedingssupplementen gericht op bevordering van sportprestaties, gewichtsverlies en libido

Stof	Stofklasse	Referentie
bisoprolol	bètablokker	21
dapoxetine	serotonineheropnameremmer	1
evodiamine	alkaloïde	18
fluoxetine	serotonineheropnameremmer	1,19
furosemide	lisdiuretica	45
lorcaserin	benzazepine	1,19
phenibut (aminophenylbutyric acid)	gamma-aminoboterzuur (GABA) analoog	18
phenolphthaleïn	phthaleïn	1,19,27,46–48
pikatropin (N-nicotinoyl-GABA)	gamma-aminoboterzuur (GABA) pre-cursor	18
podophyllotoxin	podofyllotoxinederivaten	1
sennosides A and B	contactlaxantia	46
piperine	alkaloïde	18
1,3-dimethylamylamine (1,3-DMAA)	alkylamine	1,3,16–21
1,3-dimethylbutylamine (1,3-DMBA)	alkylamine	1,3,17,18,21
1,4-dimethylamylamine (1,4-DMAA)	alkylamine	3,17
2-amino-6-methylheptane (octodrine; DMHA)	alkylamine	3,17
dimethylaminoethanol (DMAE; deanol)	alkylamine	1,18
gamma-aminoboterzuur (GABA)	gamma-aminoboterzuur (GABA)	18
fursultiamine	allithiamine (vitamine B1 analoog)	18
aristolochiazuur I	aristolochiazuur	1
aristolochiazuur II	aristolochiazuur	1
diazepam	benzodiazepine	49
vitaberin (berberine)	benzylisoquinoline alkaloïde	27
higenamine	benzyltetrahydroisoquinoline	1,3,18,21,24
tetrahydrocannabinol (THC)	cannabinoïde	1
strychnine	crystalline alkaloïde	1,21
icariïn	flavonol glycoside	1
kavain	kavalactone	1
orlistat	lipstatine	19
noopept (omberacetam)	nootropic	18
2-ethylamino-1-phenylbutane	fenethylamine	50
bèta-methylfenethylamine (BMPEA)	fenethylamine	1,3,18,21–23
bèta-fenethylamine	fenethylamine	1,18,22,23,28

cathine (norpseudoefedrine)	fenethylamine	21
clobenzorex	fenethylamine	49
isopropyloctopamine;	fenethylamine	1,3,4,20,22,26
efedrine	fenethylamine	1,21,45
fenfluramine	fenethylamine	48,51
halostachine	fenethylamine	1
hordenine	fenethylamine	1,18,22,26
methylefedrine	fenethylamine	21
N,alfa-diethyl-fenylethylamine (N,alfa-DEPEA)	fenethylamine	52
N,beta-diethyl-fenylethylamine (N,beta-DEPEA)	fenethylamine	52
N,N-DEPEA	fenethylamine	52
N,N-dimethylfenethylamine (N,N- DMPEA)	fenethylamine	18
N-beta-dimethylfenethylamine (fenpromethamine; vonedrine; N-methyl-beta- methylfenethylamine; N,beta- DMPEA)	fenethylamine	3,21
N-Ethyl- α -ethyl-fenethylamine (ETH)	fenethylamine	28
N-methyl-bèta-fenethylamine	fenethylamine	18
N-Methyl-difenethylamine (demelverine)	fenethylamine	18
N-methyltyramine	fenethylamine	18,22,26
norefedrine (fenylpropanolamine)	fenethylamine	45
octopamine	fenethylamine	1,22,26
oxilofrine (methylsynefrine)	fenethylamine	1,3,4,18,21,22,26,27
fentermine	fenethylamine	1,49,51
synephrine	fenethylamine	1,4,18- 20,22,26,27,29
tyramine	fenethylamine	26
mucuna (L-DOPA)	fenethylamine (catechol amine)	18
dendrobine	plant alkaloid	18
heliotrine	pyrrolizidine alkaloïde	1
lycopsamine	pyrrolizidine alkaloïde	1
monocrotaline	pyrrolizidine alkaloïde	1
monocrotaline-N-oxide	pyrrolizidine alkaloïde	1
senecionine-NO	pyrrolizidine alkaloïde	1
seneciphylline-NO	pyrrolizidine alkaloïde	1
ajmalicine (δ -yohimbine)	rauwolfia alkaloïde	20

corynanthine/rauwolscine	rauwolfia alkaloiden	20
rauwolscine	rauwolfia alkaloiden	1
rescinnamine	rauwolfia alkaloiden	20
reserpine	rauwolfia alkaloiden	20
yohimbine	rauwolfia alkaloiden	1,4,18,20
benzyl-sibutramine	sibutramine	1,53
N-desmethylsibutramine	sibutramine	54
N-didesmethylsibutramine	sibutramine	54,55
sibutramine	sibutramine	1,19,27,46- 48,53-55
aminotadalafil	sildenafil	1
sildenafil	sildenafil	1,19
tadalafil	sildenafil	1
thiodimethyl sildenafil	sildenafil	1
thiohomosildenafil	sildenafil	1
thiosildenafil	sildenafil	1
mazindol	sympathomimetische amine	46,49
sulbutiamine	thiamine (vitamine B1 analog)	18
hydrochlorothiazide	thiazide	46
bisacodyl	trifenylnmethaan	46
scopolamine	tropane alkaloiden	1
5-methoxytryptamine (mexamine)	tryptamine	18
cafeïne	xanthine	1,4,18- 20,27,45,49,51
theacrine	xanthine	18
theobromine	xanthine	18
theofylline	xanthine	4,18



Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
1	Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Pilot studies

In dit onderzoek worden een aantal technieken toegepast waarvan het van groot belang is dat onderzoekers deze goed beheersen. Hiervoor is opleiding en training vereist, wat middels pilotstudies zal worden verworven. Gedurende pilotstudies worden onderzoekers opgeleid voor de volgende technieken: (1) het plaatsen van de telemetrieapparatuur in de dieren, (2) het aanbrengen van permanente canules, (3) isolaties van mesenteriale vaten en hersenweefsel, (4) het plaatsen van mesenteriale vaten in een functionerende myograafopstelling en (5) optimalisatie van het synaptosoom bereidingsprotocol. De vakgroep heeft de kennis in huis om deze onderzoekers op te leiden voor de bovenstaande technieken. De pilotstudie voorafgaande aan de *in vivo* studie is afgerond indien telemetriezenders en permanente canules succesvol zijn geplaatst en de dieren hersteld zijn van deze operatie. Hoe succesvolle plaatsing en succesvol herstel gemeten wordt, zal in samenspraak met de Instantie voor Dierenwelzijn (IVD) afgestemd worden in het werkprotocol. Het andere criterium om verder te mogen naar de *in vivo* studies voor dataverzameling is dat er significante verschillen in de uitleesparameters te zien moeten zijn na toediening van de controlestof adrenaline. De primaire uitleesparameters om sympathomimetische effecten te kunnen bestuderen in de *in vivo* studies zijn: (1)

hartslagfrequentie, (2) contractiekracht van het hart, (3) bloeddruk en (4) lichaamstemperatuur. Er zijn geen secundaire uitleesparameters.

In vivo studies

De *in vivo* studies starten met een operatie om de telemetrie apparatuur in de dieren in te brengen. Na een herstelperiode van minimaal twee weken wordt het dier intraveneus blootgesteld aan de laagste dosis van een teststof. Voorafgaand hierop zal eerst nog een vehicle controle toegediend worden en de ED50 van de positieve controle adrenaline (om de functie van het sympathisch zenuwstelsel te testen). Met draadloze telemetriezendes worden effecten op het sympathisch zenuwstelsel gemeten. Dit zijn: bloeddruk, hartslagfrequentie, hartslagcontractiekracht (inotropie) en lichaamstemperatuur. Indien er een effect optreedt en dit effect stabiliseert, dan wordt een volgende, hogere, dosis van de concentratiereeks toegediend. Indien er bij de laagste concentratie geen effect optreedt, zal er overgegaan worden op de volgende dosis in de reeks. De verwachting is dat de effecten na i.v. toediening binnen 5 à 20 minuten zullen optreden. Hierbij is een marge ingebouwd en wordt er maximaal 30 minuten gewacht om een effect te observeren. Indien er na 30 minuten geen effect geobserveerd wordt, wordt een hogere dosering toegediend. Er zullen 8 doseringen toegediend worden om dosis-response relaties te kunnen vaststellen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van half-logaritmische doseringen. Na de hoogste dosering van een teststof zal opnieuw de ED50 van adrenaline toegediend worden als controle. Nadat dit voor de eerste teststof gedaan is, vindt er een wash-outperiode plaats. Om er zeker van te zijn dat de teststof en eventuele metabolieten geklaard zijn, en om dieren ruim de tijd te geven om te herstellen is gekozen voor een periode van minimaal één week. Indien de dieren geen bijwerkingen van de teststof ondervinden en hersteld zijn, zal na één week een tweede teststof toegediend worden op dezelfde manier als dit voor de eerste teststof gedaan is. Er wordt ernaar gestreefd om dieren zoveel als mogelijk her te gebruiken (met een maximum van 5 teststoffen per dier, met de wash-outperiodes tussen de verschillende teststoffen). Na de laatste wash-out periode worden de dieren opgeofferd middels decapitatie en wordt overgegaan op de *ex vivo* studies. De tijdslijn van de procedures die een dier ondergaan staat beschreven in Figuur 1 op de volgende bladzijde.

Ex vivo studies

Voor de synaptosomale (*in vitro*) incubaties met geïsoleerd hersenweefsel zijn de uitleesparameters: (1) expressie van (gefosforyleerde) transporters en receptoren van catecholamines en trace amines en (2) de effecten van de teststoffen op heropname van catecholamines en trace amines. Gen- en eiwitexpressie van transporters en receptoren zal gemeten worden met moleculaire technieken zoals qPCR en Western blot analyse. Catecholamines en trace amines worden gekwantificeerd met chemisch analytische methodes zoals vloeistofchromatografie-massaspectrometrie. Deze studies zijn van belang om de selectie van teststoffen die agonistische- of antagonistische effecten vertonen in de voorafgaande *in vitro* studies te bestuderen in een fysiologisch relevanter onderzoeksmodel dan de eerder uitgevoerde *in vitro* receptoractivatie studies. De uitleesparameters van deze studies zeggen iets over de indirecte sympathomimetische effecten van de (ongereguleerde) teststoffen aanwezig in voedingssupplementen. In de pilotstudies wordt het protocol voor bereiding van synaptosomen geoptimaliseerd en dient de controlestof tyramine significantie verschillen te laten zien in catecholamineconcentraties.

Uitleesparameters voor de *ex vivo* studies met de mesenteriale weerstandsvaten zijn vasoconstrictie en vasodilatatie, welke met een *small vessel* myograaf gemeten gaan worden. Deze uitleesparameters zijn van belang om de effecten van eerder *in vitro* aangetoonde adrenoreceptoragonisten en -antagonisten op orgaanfunctie te bestuderen. Voordat de teststoffen in dit model bestudeerd worden, worden er pilot/controlestudies uitgevoerd. Criteria om de teststoffen in het model te testen zijn: (1) intact endotheel (relaxatietest met acetylcholine) en (2) receptoronafhankelijke werking van de vasculaire gladde spiercellen (depolarisatietest met kalium).

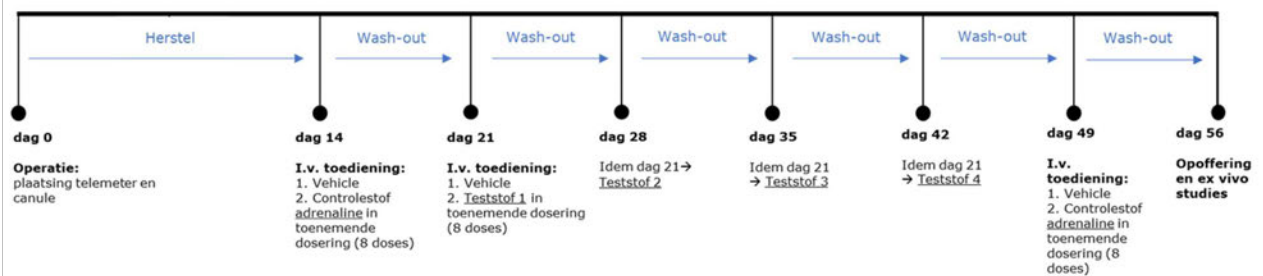
Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Na afronding van de pilotstudies wordt er overgegaan op de *in vivo* studies waarbij de dieren blootgesteld zullen worden aan de teststoffen. Een overzicht van het tijdsverloop is weergegeven in Figuur 1. Telemetriezendes en permanente canules worden in de dieren geplaatst. Deze operatie gebeurt onder narcose. Om de pijn centraal te verdoven, wordt een opiaat toegediend. Daarnaast wordt een NSAID

toegediend tegen perifere pijn en ontstekingen. Na deze operatie hebben de dieren minimaal twee weken nodig om te herstellen. Om er zeker van te zijn dat de hersteltijd lang genoeg is, is er gekozen voor een hersteltijd van twee weken. Na de herstelperiode worden de wakkere dieren (om TAAR1-gemedieerde effecten niet uit te sluiten) aan de controlestof adrenaline intraveneus blootgesteld. Er wordt gestart met toediening van een vehicle controle. Hierna wordt de laagste concentratie van de adrenaline toegediend. Na stabilisatie van eventuele effecten wordt een volgende, iets hogere, concentratie toegediend. Dit wordt weer gevolgd door een periode voor het stabiliseren van de effecten en een volgende hogere concentratie. Op deze manier kan er een dosis-response relatie verkregen worden van de controlestof adrenaline (maximaal 8 doseringen). Naar verwachting zal stabilisatie van effecten binnen enkele minuten tot een uur optreden. Na toediening van de hoogste concentratie en meting van de daaropvolgende effecten, gaat er een wash-outperiode van één week van start. Hierna zal de eerste teststof op eenzelfde manier als de controlestof toegediend worden (eerst toediening van de vehicle, dan toediening van de laagste dosering van de teststof, gevolgd door toenemende doseringen van de teststof, in totaal maximaal 8 doseringen). In het project zullen er in de *in vivo* studies maximaal 10 teststoffen bestudeerd worden. Ieder dier zal aan maximaal vier teststoffen blootgesteld worden (met daartussen de wash-periode van één week). Één week voor toediening van de eerste teststof wordt de controlestof adrenaline in toenemende doseringen toegediend. Dit wordt herhaald één week na toediening van de vierde teststof (zie Figuur 1).

Hoewel de klaringssnelheid van de meeste stoffen onbekend is, is er voor de bepaling van de wash-outperiode gekeken naar gegevens van de vergelijkbare stof methamfetamine. De halfwaardetijd van methamfetamine is ongeveer 70 minuten in ratten na iv-toediening¹. Deze stof zal na ongeveer 280 minuten helemaal geklaard zijn (70 maal omrekeningsfactor 4 = 280 minuten). Om er zeker van te zijn dat metabolieten ook geklaard zijn en om de dieren ruim tijd te geven om te herstellen van mogelijke effecten, is er gekozen voor een ruime wash-out periode van één week. Ook vanuit praktisch oogpunt geeft dit de onderzoekers voldoende tijd om alle studies goed te kunnen uitvoeren en voor te bereiden.

Na toediening van de controle stof adrenaline na toediening van de vier teststoffen gaat de laatste wash-outperiode van één week van start. Hierna zullen de dieren opgeofferd worden middels decapitatie, waarna hersenweefsel geïsoleerd wordt voor bereiding van de synaptosomen en de darmen met het mesenterium uit het dier gehaald worden voor isolatie van de mesenteriale vaten. Er zullen maximaal tien stoffen getest worden in de twee *ex vivo* modellen.



Figuur 1 – Tijdlijn van de proefopzet per dier

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

Om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken worden de dieren na blootstelling aan een teststof en na de wash-outperiode hergebruikt voor de bestudering van andere teststoffen. In totaal worden er 4 teststoffen in een dier bestudeerd en twee keer de controlestof adrenaline (zie Figuur 1). Ook wordt het aantal benodigde dieren beperkt door de prioritering gevolgd op de literatuur- en *in vitro* studies.

Het minimaal aantal benodigde dieren wordt bepaald met een powerberekening (alfa = 0.05 en power = 0.8) voor de vier uitleesparameters van de *in vivo* studies (hartslagfrequentie, contractiekracht van het hart, bloeddruk en lichaamstemperatuur). Deze aantallen zijn ook genoeg voor de *ex vivo* studies aangezien er

meerdere mesenteriale vaten uit één dier geïsoleerd worden en er meerdere aliquots synaptosomen van het brein van één dier gemaakt kunnen worden. Ook zal een drop-outberekening toegepast worden om rekening te houden met eventueel uitval van dieren. Wanneer de i.v. canule waardoor de teststoffen worden toegediend langer dan 5 weken wordt gebruikt, neemt het risico op uitval toe^{2,3}. Op basis van de ervaring die 5.1 lid2h heeft met het uitvoeren van studies met i.v. canules wordt een uitval van ongeveer 20% van de dieren verwacht.

Rekening houdend met bovenstaande zijn naar schatting maximaal 80 dieren nodig voor dit project. Het aantal dieren is als volgt berekend: er zullen maximaal 10 teststoffen bestudeerd worden met een n=8. Er zullen dus 80 metingen zijn per teststof. Als er uitgegaan wordt van het worst-case scenario, dat er per dier slechts 1 stof gemeten kan worden, dan zijn er 80 dieren nodig voor de n=8 van de 10 teststoffen. Hiervan wordt voor 20% (16 dieren) uitval verwacht. In dat geval blijven er 64 dieren over met de intentie om hierin 5 stoffen per dier te onderzoeken. Daarnaast zullen er maximaal 20 dieren nodig zijn voor het trainen van twee onderzoekers voor de *ex vivo* en *in vivo* studies.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Rat	Dieren gefokt voor onderzoek (Charles River)	Volwassen (12 weken)	126	mannelijk en vrouwelijk	nee	Wistar Kyoto

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en succesvoller geïsoleerd kunnen. Doordat de isolaties sneller plaats kunnen vinden dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere vaten te isoleren uit het mesenterium van de rat. Dit zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren en ook voor verfijning van de dierproeven doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden. Het gebruik van lagere diersoorten, zoals de zebrafish, is hier uitgesloten vanwege de uitleesparameters die in deze studie bestudeerd zullen worden. Het is niet mogelijk de uitleesparameters in deze lagere diersoorten te kwantificeren.
Herkomst	Er is gekozen voor dieren gefokt voor onderzoeksdoeleinden door erkende fokkers, om de uitleesparameters in een uniforme groep dieren te kunnen bestuderen.
Levensstadia	De keuze gaat uit naar volwassen dieren om zo de gebruikersgroep van voedingssupplementen in de samenleving na te bootsen ⁴ .
Aantal	Het aantal dieren is gebaseerd op de powercalculatie en de drop-outberekening die in het werkprotocol beschreven worden. Er zijn maximaal 88 ratten nodig om alle stoffen (max. 10 + 1 controlestof) 8 keer (n=8) in een dier te testen. Voor dit aantal wordt er uitgegaan van het worstcasescenario waarbij er slechts één stof in één dier getest kan worden. Het streven is echter om maximaal 5 stoffen (4 teststoffen + 1 controlestof) in een dier te testen, indien er geen bijwerkingen van de behandelingen optreden, waardoor de verwachting is dat niet alle dieren nodig zullen zijn. De verwachting is dat de uitval maximaal 20% zal zijn (18

	<p>ratten). In dat geval zijn er 106 dieren met de intentie om hierin 4 teststoffen en controlestof adrenaline per dier te onderzoeken. Dan kunnen er in het meest gunstige scenario 530 condities onderzocht worden ($106 \times 5=530$), wat betekent dat iedere teststof 48 keer bestudeerd kan worden ($530 \text{ condities}/11 \text{ stoffen} = 48,2$ herhalingen per stof). Er zijn echter maar 8 herhalingen per stof nodig ($n=8$), wat aangeeft dat waarschijnlijk niet alle dieren nodig zullen zijn om deze studie uit te voeren, uitgaande van een gunstig scenario. In het werkprotocol zal dit verder toegelicht worden middels de powerberekening. Daarnaast zijn er maximaal 20 ratten nodig voor de pilotstudies om twee onderzoekers op te leiden voor de uitvoering van de experimentele procedures. Dit is geschat op basis van de ervaring die 5.1 lid2h heeft met dit soort studies en het inwerken van de onderzoekers op de benodigde technieken.</p> <p>Totaal aantal dieren: $88 + 18 + 20 = 126$ dieren. (88 dieren om alle stoffen 8 keer in een dier te kunnen meten; 18 dieren om te compenseren voor de maximaal te verwachten dropout van 20%; 20 dieren voor de pilotstudies en het trainen van de onderzoekers.</p> <p>Statistiek: Er wordt voor alle uitleesparameters uitgegaan van een effectgrootte van 20%. Dit komt ongeveer overeen met de toename in de uitleesparameters wanneer een individu zich inspant (ten opzichte van de uitleesparameters in rusttoestand). Bijvoorbeeld, in de studie van Cornelissen et al. (2010) wordt er in de mens een hartslagfrequentie van 71.2 slagen/ minuut gemeten in rusttoestand. Gedurende lage inspanning is de hartslagfrequentie 97.5 slagen/ minuut. Dit is een toename in effect van ongeveer 27%. De variantie die ten grondslag ligt aan de $n=8$ en de effectgrootte van 20% is 9%. Dit is onder andere gebaseerd op de standaarddeviaties van basale systolische bloeddrukmetingen in eerdere studies met volwassen WKY ratten ^{15, 16, 17}.</p> <p>In de powercalculatie in het werkprotocol zal dit verder toegelicht worden.</p>
Geslacht	N.v.t. – De keuze gaat uit naar ratten van zowel het mannelijke als het vrouwelijke geslacht om zo de gebruikersgroep van de voedingssupplementen in de samenleving na te bootsen. Er zijn echter wel verschillen in cardiovasculaire regulatie door het sympathisch zenuwstelsel ⁵ , daarom zijn er in deze studie extra dieren nodig om interferentie van effecten van geslachtsverschillen uit te sluiten.
Genetisch gewijzigd	N.v.t.
Stam	<p>Er is gekozen voor Wistar Kyoto ratten, omdat zij een normale bloeddruk hebben en veelvuldig gebruikt worden als controlemodel voor onderzoek naar het cardiovasculaire systeem ⁶⁻⁸.</p> <p>Referenties De referenties zijn beschreven op de laatste bladzijde van dit document.</p>

C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

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

D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voor het inbrengen van de telemetrieapparatuur en de canule wordt een opiaat gegeven om de pijn centraal te verdoven. Er wordt een NSAID gegeven als perifere pijnstillers en ontstekingsremmers.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De dieren kunnen eventueel stress ervaren. Het welzijn kan mogelijk ook aangetast worden door een infectie via de canule. Daarnaast kunnen de teststoffen het welzijn eventueel tijdelijk aantasten, bijvoorbeeld door verhoogde hartslag, bloeddruk of door stemmingsverandering.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De dieren kunnen mogelijk stress ervaren wanneer zij uit hun kooi worden gehaald en overgeplaatst worden naar de plaats voor de levensbeëindiging. Een andere stressfactor kan de i.v. toediening van de teststoffen zijn. Daarnaast is het doel van dit onderzoek om de sympathomimetische effecten van een aantal teststoffen te bestuderen. Dieren kunnen dus eventueel ook ongemak ervaren doordat het sympathisch zenuwstelsel is geactiveerd met gevolgen zoals een onrustig gevoel, verhoogde hartslag, verhoogde bloeddruk.

Een infectie kan eventueel ontstaan als gevolg van het plaatsen van de telemetrieapparatuur en de canule, of bij toediening van de teststoffen via de canule.

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

De dieren worden gehanteerd door ervaren werknemers, die door hun ervaring in het omgaan met proefdieren weten hoe eventuele stress zoveel als mogelijk vermeden wordt. Dieren worden getraind om te wennen aan de experimentele handelingen.

Om mogelijke infecties te voorkomen zal er aseptisch gewerkt worden en wordt er een "vascular access port button" op de vascular access port geplaatst. Indien er bijwerkingen van de te testen stoffen worden vastgesteld met uitgesproken cardiovasculaire effecten zoals bv ritmestoornissen of hypo- of hypertensie die niet transient of corrigeerbaar zijn wordt het experiment voor het dier beëindigd. Wanneer dit optreedt, zal eerst de toediening van teststof gestopt worden. Wanneer er dan na 30 minuten nog geen verbetering is in de cardiovasculaire homeostase, dan wordt het experiment beëindigd en zal het dier opgeofferd worden.

E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Er zijn 2 fases in het project waarbij de humane eindpunten verschillend worden gehanteerd:

1 . In de post-operatieve periode:

Humane eindpunten worden gehanteerd indien er complicaties optreden na de operatie met afwijkingen van verwacht herstel.

Deze worden gebaseerd op:

- Gewichtsverlies: In de eerste dagen na de operatie kan er gewichtsverlies optreden als gevolg van de operatie en de toegediende opiaten. Dit gewichtsverlies is tijdelijk van aard. Na enkele dagen herstelt het gewichtsverlies. Er wordt bij beoordeling van gewichtsverlies rekening gehouden met het gewicht van het implantaat. Indien het gewichtsverlies niet herstelt na enkele dagen zoals verwacht wordt (progressief gewichtsverlies) of er meer dan 15% gewichtsverlies optreedt, wordt het dier uit experiment gehaald.
- Klinische symptomen: de eerste dagen na de operatie kunnen dieren zich ziek voelen of buikpijn hebben. Dit kan leiden tot verminderde activiteit, porfyrie, minder verzorgde vacht, verminderde eetlust en tekenen van buikpijn (back-arch, twist, wincing, whrite, gelaatsuitdrukking indicatief voor pijn). De dieren krijgen pijnstilling en post-operatieve zorg. Humane eindpunten worden toegepast indien er
 - o obstipatie optreedt tgv ileus,
 - o dieren geen progressief herstel van de operatie vertonen
 - o abdominale hernia wordt vastgesteld
 - o Geen verbetering van pijnsymptomen optreden ondanks pijnstilling
 - o er een indicatie is voor sepsis
 - o een infectie optreedt ten gevolge van de canule en/of telemetrieoperatie die niet behandelbaar is.
 - o tekenen van inwendige bloeding in de post-operatieve periode
- Technische eindpunten: niet functioneren van de telemetriezender of verstopte canule.

2. in de testperiode:

Na herstel van de operatie worden er humane eindpunten gehanteerd. Deze worden gebaseerd op:

- Het optreden van bijwerkingen ten gevolge van de testsubstanties: Ten gevolge van het toedienen van de teststoffen kunnen er tijdelijke veranderingen optreden in cardiovasculaire parameters en tijdelijke veranderingen in gedrag. Indien deze niet van voorbijgaande aard zijn of niet corrigeerbaar wordt het dier uit experiment genomen. Humane eindpunten zijn gebaseerd op telemetrie data in combinatie met klinische symptomen gebaseerd op onder andere bewustzijn, activiteit, houding, gedrag, interactie met kooigenoten, lichaamsconditie, gang en gewicht. Bij gewichtsverlies van meer dan 15% of klinische symptomen die indicatief zijn voor matig ongerief wordt een dier uit experiment gehaald. Er wordt een welzijnsscoringslijst opgesteld en afgestemd met de IvD. Wanneer de toename in bloeddruk meer dan 50 mmHg is en wanneer de hartslagfrequentie meer dan 100 slagen/minuut toeneemt, worden er humane eindpunten gehanteerd.
- Technische eindpunten: niet functioneren van de telemetriezender of verstopte canule.

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

- Kans op complicaties na operatie: <5%
 - Kans op complicaties ten gevolge van cardiovasculaire bijwerkingen van de testsubstantie waardoor dier uit experiment genomen wordt: 10%
 - Kans op technische eindpunten (voornamelijk het dichtzitten van de infuuslijn): 5%
- Totaal 20%

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Bij de operatie om de telemetriezenders en de canule in de dieren te plaatsen hoort de classificatie "matig ongerief". De i.v. toediening van de teststoffen zal zorgen voor "mild ongerief" indien er geen bijwerkingen worden vastgesteld. Hergebruik van de dieren om een nieuwe teststof te evalueren is mogelijk indien de voorgaande teststoffen maximaal mild en geen-blijvend ongerief/bijwerkingen veroorzaakt hebben.

Tijdens de pilot worden de volgende procedures uitgevoerd die bijdragen aan ongerief voor de dieren:

- Operatie om telemetriezenders en de canule in de dieren te plaatsen (matig ongerief)
- Doding van de dieren (mild ongerief)

Tijdens het hoofdexperiment worden de volgende procedures uitgevoerd die bijdragen aan ongerief voor de dieren:

- Operatie om telemetriezenders en de canule in de dieren te plaatsen (matig ongerief)
- I.V. toediening van de teststoffen (mild ongerief)
- Doding van de dieren (mild ongerief)

100% van de dieren zal cumulatief mild ongerief ondergaan. Door de repeterende toedieningen van de teststoffen (maximaal 5 weken na elkaar), bouwt het ongerief zich op.

G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	<p>De <i>in vitro</i> screening met cellijnen die de adrenoreceptoren ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$) en TAAR1 tot overexpressie brengen, zorgen voor vervanging van <i>ex vivo</i> dierproeven met een groot deel van de te onderzoeken teststoffen. Teststoffen die in deze <i>in vitro</i> screening geen effect vertonen worden niet onderzocht in de <i>ex/in vivo</i> dierstudies, omdat de verwachting is dat bij de afwezigheid van <i>in vitro</i> effecten er ook geen <i>ex vivo</i> effecten gemeten gaan worden. Ook stoffen met milde <i>in vitro</i> effecten ($EC_{50} > 10 \mu M$ en $E_{max} < 70\%$) worden niet verder bestudeerd in de dierstudies.</p> <p>Momenteel is het nog niet mogelijk om sympathomimetische effecten van deze stoffen in mensen te onderzoeken. Om een duidelijk beeld te krijgen van het verloop van eventuele effecten worden hartslagfrequentie, hartcontractiekracht en bloeddruk continu gemonitord (telemetrie). Continue meting van bloeddruk is in mensen alleen mogelijk door de inbreng van een arteriële canule¹³. Het inbrengen van een arteriële canule is een te invasieve procedure voor humane studies. Daarom is nog niet mogelijk deze dierstudie te vervangen door een humane <i>in vivo</i> studie.</p>
Vermindering	<p>De <i>in vitro</i> receptoractivatie studies zorgen ook voor vermindering in het aantal benodigde dieren voor de <i>in vivo</i> en <i>ex vivo</i> dierproeven. Stoffen die <i>in vitro</i> geen effecten vertonen worden niet meegenomen in de <i>in/ex vivo</i> dierstudies, waardoor het aantal benodigde dieren afneemt. Door het gebruik van wash-outperiodes in de <i>in vivo</i> studie kunnen er meerdere stoffen in één dier worden bestudeerd, wat ook zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren.</p> <p>Daarnaast zullen er zoveel als mogelijk mesenteriale vaten uit één dier geïsoleerd worden, waardoor er meerdere teststoffen tegelijkertijd bestudeerd kunnen worden en er uiteindelijk minder dieren nodig zijn om effecten van alle stoffen te bestuderen.</p> <p>Ook geeft de powerberekening aan wat het minimaal aantal benodigde dieren is om effecten te kunnen waarnemen.</p>
Verfijning	

Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en succesvoller geïsoleerd kunnen. Doordat de isolaties sneller plaats kunnen vinden dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere vaten te isoleren uit het mesenterium van de rat. Dit zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren en ook voor verfijning van de dierproeven doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden.

Daarnaast zijn de proeven verfijnd door meerdere organen/weefsels uit één dier te isoleren. De proeven met de mesenteriale vaten horen met vers geïsoleerde organen uitgevoerd te worden ^{7,9}.

De ingebouwde telemetriezendes kunnen bloeddruk, hartslagfrequentie, hartcontractiekracht en lichaamstemperatuur continu meten. Dit zorgt ook voor verfijning van de proef, omdat er gemonitord kan worden of deze parameters bij de dieren op gezonde niveaus zijn (buiten de experimenten met toediening van mogelijk sympathomimetische stoffen om). Ook verfijnen de telemetriezendes de dierproef, doordat er geen extra handelingen met de dieren uitgevoerd hoeven te worden tijdens de blootstellingen aan de teststoffen. De dieren worden op die momenten met rust gelaten.

Daarnaast worden zowel de dieren als de uitvoerders getraind voor het flushen van de canule, waardoor de proef ook verfijnd wordt. Hierdoor wordt de kans kleiner dat canules verstopt raken en dieren hier eventueel ongemak van ondervinden.

Referenties

De referenties zijn beschreven op de laatste bladzijde van dit document

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

I. Herhaling

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

n.v.t.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

De dieren worden gedood om de organen te isoleren die nodig zijn voor de *ex vivo* studies voor de beantwoording van de hoofd- en subvragen.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

De dieren worden gedood middels decapitatie. De keuze gaat uit naar deze dodingsmethode, omdat deze methode minimale effecten heeft op het hersenweefsel dat gebruikt wordt voor de latere *ex vivo* studies. Er zal geen anestheticum in de hersenen achterblijven en er zal geen beschadiging optreden aan de hersenstam (in tegenstelling tot een overdosis anesthesie)^{10,11}. Daarnaast kunnen andere methoden, zoals een overdosis anesthesie en CO₂ inhalatie, de vaatfunctie beïnvloeden, wat niet wenselijk is voor de latere *ex vivo* vaatstudies¹². In de literatuur staat, tot zover bekend, niet beschreven of decapitatie de vasculaire functie beïnvloedt. Echter, de voordelen van deze dodingsmethode voor de kwaliteit van het hersenweefsel zijn groter dan de eventuele nadelige (onbekende) effecten op de vaten. Daarnaast worden alle dieren op dezelfde manier gedood, inclusief de controles, waardoor correctie voor eventuele effecten is ingebouwd in de studie.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

n.v.t.

Referenties

1. Milesi-Hallé, A., Hendrickson, H. P., Laurenzana, E. M., Gentry, W. B. & Owens, S. M. Sex- and dose-dependency in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of (+)-methamphetamine and its metabolite (+)-amphetamine in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **209**, 203–213 (2005).
2. Koeslag, D., St, A., Russell, J. C., Humphreys, A. S. & Russell A, J. C. *A technique for long-term venous cannulation in rats.* (1984).
3. de Jong, W. H., Timmerman, A. & van Raaij, M. T. M. Long-term cannulation of the vena cava of rats for blood sampling: local and systemic effects observed by histopathology after six weeks of cannulation.

4. Razenberg, L., Notenboom, S. & de Wit-Bos, L. Het gebruik van workout-supplementen door sporters in Nederland. *RIVM-rapport 0116*, (2021).
5. Evans, J. M. *et al.* Gender differences in autonomic cardiovascular regulation: spectral, hormonal, and hemodynamic indexes. *J Appl Physiol* **91**, 2611–2618 (2001).
6. Kapsokalyvas, D. *et al.* Imaging evidence for endothelin ETA/ETB receptor heterodimers in isolated rat mesenteric resistance arteries. *Life Sciences* **111**, 36–41 (2014).
7. Vrolijk, M. F. *et al.* The supplement–drug interaction of quercetin with tamsulosin on vasorelaxation. *European Journal of Pharmacology* **746**, 132–137 (2015).
8. Sanada, L. S., Tavares, M. R., Neubern, M. C. M., Salgado, H. C. & Fazan, V. P. S. Can Wistar rats be used as the normotensive controls for nerve morphometry investigations in spontaneously hypertensive rats (SHR)? *Acta Cirúrgica Brasileira* **26**, 514–520 (2011).
9. Watanabe, M. & Okada, T. Langendorff perfusion method as an ex vivo model to evaluate heart function in rats. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1816 107–116 (Humana Press Inc., 2018).
10. Cressey, D. Best way to kill lab animals sought. *Nature* **500**, 130–131 (2013).
11. Hawkins, P. *et al.* A Good Death? Report of the Second Newcastle Meeting on Laboratory Animal Euthanasia. *Animals 2016, Vol. 6, Page 50* **6**, 50 (2016).
12. Boivin, G. P., Hickman, D. L., Creamer-Hente, M. A., Pritchett-Corning, K. R. & Bratcher, N. A. Review of CO₂ as a Euthanasia Agent for Laboratory Rats and Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **56**, 491 (2017).
13. Saugel, B., Kouz, K., Meidert, A., Schulte-Uentrop, L., Romagnoli, S. How to measure blood pressure using an arterial catheter: A systematic 5-step approach. *Critical Care* **24**:172 (2020).
14. Cornelissen, V., Verheyden, B., Aubert, A. *et al.* Effects of aerobic training intensity on resting, exercise and post-exercise blood pressure, heart rate and heart-rate variability. *J Hum Hypertens* **24**, 175–182 (2010).
15. Maris, M. E., Melchert, R. B., Joseph, J. & Kennedy, R. H. Gender differences in blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **32**, 35–39 (2005).
16. Cosson, E. *et al.* Aortic stiffness and pulse pressure amplification in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **292**, 2506–2512 (2007).
17. Blagonravov, M. L. *et al.* 24-Hour Profile of Blood Pressure, Heart Rate, Excretion of Electrolytes, and Locomotor Activity in Wistar-Kyoto and SHR Rats Under Conditions of Free-Run Rhythm. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* (2018).

Naam van het project	Testen van veiligheid van stoffen in voedingssupplementen voor mensen bij ratten
NTS-identificatiecode	NTS-NL-690452 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	32
Trefwoorden	voedingssupplementen farmcologisch actieve stoffen veiligheid; risicobeoordeling sympathisch zenuwstelsel hart- en vaatstelsel
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Cardiovasculair, bloed- en lymfestelsel Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Niet op grond van regelgeving vereist toxicologisch en ecotoxicologisch onderzoek

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Op de Nederlandse markt zijn voedingssupplementen te koop die mensen nemen voor, tijdens of na het sporten. In deze supplementen zijn stoffen gevonden waarvan de veiligheid voor de mens niet onderzocht is. Deze stoffen lijken op stoffen die het sympathisch zenuwstelsel kunnen activeren. Activering van dit zenuwstelsel zorgt voor een toename in bloeddruk, hartslagsnelheid en sterkte van de hartslag. Het is echter niet bekend of de gevonden stoffen hiervoor kunnen zorgen. Ook is het niet bekend of deze stoffen giftig kunnen zijn voor de mens. Daarom is het doel van dit onderzoek om te onderzoeken of deze stoffen het sympathisch zenuwstelsel kunnen activeren en of deze stoffen giftig kunnen zijn voor de mens. Op deze manier kan er gekeken worden of deze supplementen veilig zijn en of ze eventueel verboden moeten worden.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	Het is van belang voor de maatschappij dat er onderzoek wordt gedaan naar de effecten op het sympathisch zenuwstelsel van deze stoffen in voedingssupplementen. Zo kunnen consumenten beter ingelicht worden over de veiligheid van deze supplementen. Als de stoffen inderdaad gevaarlijk blijken, geeft dit aanleiding om de stoffen te verbieden. Zo kan mogelijk ernstige gezondheidsschade (bijv. hartaanval, hersenbloeding, sterfte) voorkomen worden. Het is bekend dat een te grote activering van het sympathisch zenuwstelsel kan leiden tot ernstige gezondheidsschade zoals hartaanval, hersenbloeding en sterfte. Ook wordt de wetenschap met de uitkomsten van dit project vooruit geholpen. Dit project zorgt namelijk voor meer kennis over de werking van de te onderzoeken stoffen en stoffen die hierop lijken.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Ratten zullen 1 operatie (onder narcose) ondergaan (max. 2 uur) voor de plaatsing van draadloze zenders in de buik en voor plaatsing van een hol buisje in een bloedvat, waar later het infuus aan verbonden kan worden. Zij krijgen in totaal maximaal 5 keer op verschillende dagen een teststof via een infuus (max. 4 uur). Omdat de hersenen na doding van het dier nodig zijn om effecten van de teststoffen op de hersenen te onderzoeken, wordt het dier gedood door onthoofding. Na overlijden worden bloedvaten en hersenen uit het lichaam gehaald. Deze organen worden gebruikt om verder te onderzoeken buiten het lichaam.</p>					
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Na de operatie kunnen de dieren matige pijn en/of stress ervaren. Zij zullen minimaal twee weken nodig hebben om te herstellen. De teststoffen kunnen de bloeddruk, ademhaling en hartslag van de dieren veranderen. Dit zal van korte duur zijn (max. 4 uur).</p>					
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamd aantal naar ernstgraad</p>			
			<p>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</p>
<p>Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)</p>	<p>126</p>	<p>0</p>	<p>0</p>	<p>126</p>	<p>0</p>	<p>0</p>
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>				
		<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Geadopteerd</p>		
<p>Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)</p>		<p>126</p>	<p>0</p>	<p>0</p>		
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Nadat de dieren zijn gedood, kunnen de effecten van actieve stoffen in voedingssupplementen op bloedvatvernauwing en -verwijding en hersencelfunctie bestudeerd worden buiten het lichaam van de dieren. Het gebruik van deze methodes buiten het lichaam van het dier zorgen ervoor dat de dieren geen nadelige bijwerkingen zullen ondervinden.</p>					

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Andere methoden om effecten op hartslag (snelheid en kracht) te bestuderen zijn studies met cellen in het lab (zonder dat er levende mensen of dieren aan te pas komen). Daarom testen we de stoffen eerst in cellen die betrokken zijn bij vaatvernauwing, vaatverwijding, hartslagsnelheid en –kracht. Stoffen die geen effecten laten zien op deze cellen, worden niet onderzocht in de dieren. Voor die stoffen hoeven dus geen ratten te worden gebruikt. Vervangen van de dierproef in zijn geheel is niet mogelijk, omdat het sympathisch zenuwstelsel uit meerdere organen bestaat en de invloed van de verschillende organen op elkaar niet is na te bootsen buiten het lichaam. Het onderzoek kan niet in mensen uitgevoerd worden, omdat voor de bloeddruk en hartslag (snelheid en kracht) continu gemeten moet worden. Hiervoor moet apparatuur in het bloedvat ingebracht worden, wat een ingrijpende procedure is voor mensen. Ook is het niet mogelijk dit onderzoek in ongewervelde diersoorten, zoals de zebravis, uit te voeren omdat bloeddruk en hartslag in deze dieren moeilijker te meten is dan in zoogdieren. Daarnaast zijn de verschillen van de receptoren in het sympathisch zenuwstelsel tussen mens en vis groter dan tussen mens en rat, waardoor de resultaten van de rat beter laten zien wat het effect van de stoffen op de mens zouden zijn.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Om zo min mogelijk dieren te gebruiken wordt het aantal dieren dat nodig is in dit project bepaald met behulp van een statistische berekening. Er zullen niet meer dieren worden gebruikt dan nodig zijn voor betrouwbare resultaten.

De eerdergenoemde test van de stoffen op cellen zonder dat er mensen of dieren aan te pas komen, zorgt ook voor vermindering in het aantal benodigde dieren voor de dierproeven. Stoffen die in de cellen geen effecten vertonen, worden niet getest op dieren, waardoor het aantal dieren dat nodig is afneemt. Er zullen meerdere teststoffen in 1 dier bestudeerd worden, om zo het aantal dieren dat nodig is te verminderen. Daarnaast zullen er zoveel als mogelijk bloedvaten uit één dier gehaald worden, waardoor er meerdere teststoffen tegelijkertijd bestudeerd kunnen worden en er uiteindelijk minder dieren nodig zijn om effecten van alle stoffen te bestuderen.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Het ongemak wordt zo minimaal mogelijk gemaakt door dieren voor de operatie pijnstilling te geven en ze veel tijd te geven om te herstellen. Ook na de operatie zullen zij pijnstilling krijgen. De ingebrachte meetapparatuur zorgt ook voor verfijning van de proef, omdat er continu gemonitord kan worden of de bloeddruk, hartslag (snelheid en kracht) en lichaamstemperatuur bij de dieren op gezonde niveaus zijn (buiten de tests met de stoffen om). Ook hoeven er zo geen extra handelingen met de dieren uitgevoerd te worden tijdens het onderzoek. De dieren worden op die momenten met rust gelaten.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en succesvoller geïsoleerd kunnen worden. Doordat de isolaties sneller plaats kunnen vinden dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere bloedvaten te isoleren uit de rat.

Dit zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden.

Er is gekozen voor ratten, omdat zij een normale bloeddruk hebben en veelvuldig gebruikt worden als controlemodel voor onderzoek naar het hart- en vaatstelsel. De keuze gaat uit naar volwassen dieren om zo de gebruikersgroep van de voedingssupplementen gericht op sportprestaties in de samenleving na te bootsen.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



Advies aan CCD

Datum 08 november 2022
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216336

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen
Aanvraagnummer: AVD202216336
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager: Over de bijlage:</p> <ul style="list-style-type: none"> - In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de dieren door de operatie om telemetrie zenders en de canule in de dieren te plaatsen matig ongerief ondergaan. Als afsluitende zin geeft u onder F aan dat 100% van de dieren cumulatief mild ongerief zal ondergaan. Als er matig ongerief plaats vindt, kan het cumulatief ongerief niet licht zijn. Kunt u het ongerief in de laatste zin corrigeren naar matig. - U geeft in de reactie richting de DEC aan dat gestart wordt met groepshuisvesting van de dieren. 1 Is er knaging aan de canule plaatsvinden, dan wordt er overgestapt op individuele huisvesting. 2 Kunt u dit toevoegen aan de bijlage dierproeven onder C? <p>Over de NTS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - In de NTS geeft u aan dat de dieren die na de procedure nog in leven zijn worden hergebruikt. Dit is niet correct omdat alle dieren na de proef worden gedood. Kunt u het hergebruik bij de 126 dieren verwijderen in het tabblad? - Bij vervanging schrijft u dat uw onderzoek niet mogelijk is in ongeweelde dieren, zoals de zebravis. Wij verzoeken u om dit voorbeeld aan te passen aangezien de zebravis een geweelde diersoort is.
---------------	--



Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen				
	Ratten (Rattus norvegicus)	Wistar Kyoto	126	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen
Ratten (Rattus norvegicus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--






2 DEC advies

DEC-advies	Het DEC advies is volledig en kan als grondslag dienen voor het besluit.
-------------------	--

Overzicht van opmerkingen bij 10. AdviesNotaCCD - d.d. 8-11-2022_Met opmerkingen.pdf

5.1 lid2e

Pagina: 2

-
-  Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 17-11-2022 14:26:12 +01'00'
Zodra geconstateerd wordt dat de dieren aan de canule zullen gaan knagen
-
-  Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 17-11-2022 14:26:56 +01'00'
Kunt u individuele huisvesting als afwijkende vorm van huisvesten beschrijven en onderbouwen onder C?
-  Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 17-11-2022 15:02:16 +01'00'
En eventueel het ongerief van de individuele huisvesting meenemen in de ongeriefclassificatie.
-
-  Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 17-11-2022 14:35:23 +01'00'
In de NTS gebruiken ze ook de term 'sympathisch zenuwstelsel'. Dit moeten ze even uitleggen,
-
-  Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 17-11-2022 14:36:15 +01'00'
Onder "Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe" hebben ze het ook over het isoleren van organen. Dit is te technisch voor het publiek. Moeten ze ook aanpassen of verduidelijken.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1. Weegt in het voorgestelde onderzoek naar de cardiovasculaire effecten van "traceamine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt aangedaan?

2. o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel (dieren ondergaan ongerief en worden uiteindelijk gedood)

o Waarden die voor de doelgroep (sporters) bevorderd worden: substantieel voordeel (reductie van cardiovasculaire risico's)

o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel. De kans dat onderzoekers meer inzicht krijgen in de mogelijke cardiovasculaire effecten van elementen uit voedingssupplementen, en dat onderzoekers hierover kunnen rapporteren aan de NVWA en publiceren is realistisch.

De 5.1 lid2h is van mening dat de belangen van gebruikers van prestatiebevorderende voedingssupplementen zwaarder wegen dan de belangen en waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen (voornamelijk een operatie onder anesthesie met aanbrengen van telemetrische sensoren en een permanente canule) en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast vanwege de standaard huisvesting.

3. De 5.1 lid2h beantwoordt de centrale morele vraag 'weegt het onderzoek naar de cardiovasculaire effecten van "trace-amine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt aangedaan?' bevestigend.

De 5.1 lid2h onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar

haar mening weegt echter het substantiële belang van dit project, en meer specifiek de (substantiële) belangen van de gebruikers van voedingssupplementen, zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering van de dieren.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no-go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de **5.1 lid2h** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel 'Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen' als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de **5.1 lid2h** het projectvoorstel van een positief advies.

Het is aannemelijk dat de doelstelling (bepaling van mogelijke cardiovasculaire effecten van bepaalde voedingssupplementen) behaald zal worden. De **5.1 lid2h** heeft de onderzoeker wel gevraagd te verklaren dat dit werk niet valt onder 'regulier toxicologisch onderzoek'. Zij hebben verklaard dat dit niet het geval is omdat het hier primair gaat om fysiologisch onderzoek. Onderzoek dat zij goed kunnen uitvoeren vanwege hun specialisatie.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.
Citaat: Het uitgebrachte DEC-UM advies is niet unaniem tot stand gekomen. Eén DEC-lid nam een minderheidsstandpunt in. Sporters zijn

een belangrijke uiteindelijke stakeholder in dit project dat gericht is op het bepalen van de veiligheid van sportvoedingssupplementen. Sportvoedingssupplementen die op de markt zijn kunnen onveilig zijn, omdat de veiligheid ervan niet van tevoren vastgesteld hoeft te worden door producenten. In dit onderzoek worden ratten ingezet om deze veiligheid te bepalen. Bescherming van sporters kan echter ook gepromoot worden door weetwat-je-eet-achtige publieke campagnes in plaats van het inzetten van proefdieren. Sporters hebben uiteindelijk een eigen verantwoordelijkheid. In die zin is dit onderzoek maatschappelijk vervangbaar. Op basis hiervan, en gekoppeld aan het matige ongerief voor de dieren, kwam dit DEC-lid tot een negatief advies.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:
Citaat: Een knelpunt is de vraag of dit soort veiligheidsonderzoek dat (in dit geval) voortkomt uit een NVWA rapport over risico's van nieuwe voedingssupplementen opgepakt moet worden bij een universiteit, ook al hebben ze de wetenschappelijke expertise. Is dat wel een taak voor een universiteit?

Een ander knelpunt betrof de vraag hoe het belang van een dierproef ingeschat moet worden dat uiteindelijk ten dienste staat van verhoging van de individuele performance binnen een sport.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

2 Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. 3

4 Inhoudelijke beoordeling


3V's


Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.


Hergebruik

Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Pagina: 5

 Nummer: 1 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 17-11-2022 14:42:37 +01'00'
Entertje

 Nummer: 2 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Doorhalen Datum: 17-11-2022 14:43:00 +01'00'
Bolletje


 Nummer: 3 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 17-11-2022 14:43:22 +01'00'
Zou hier nog even ingaan op de knelpunten die de DEC benoemt.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen		
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Het uitgebrachte DEC advies is niet unaniem tot stand gekomen. Eén DEC lid heeft een minderheidsstandpunt ingenomen. Deze vindt dat het onderzoek maatschappelijk vervangbaar¹, door de inzet van publieke campagnes in plaats van proefdieren. 

5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



Advies aan CCD

Datum 01 december 2022
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216336

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen
Aanvraagnummer: AVD202216336
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager: Over de bijlage:</p> <ul style="list-style-type: none">- In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de dieren door de operatie om telemetrie zenders en de canule in de dieren te plaatsen matig ongerief ondergaan. Als afsluitende zin geeft u onder F aan dat 100% van de dieren cumulatief mild ongerief zal ondergaan. Als er matig ongerief plaats vindt, kan het cumulatief ongerief niet licht zijn. Kunt u het ongerief in de laatste zin corrigeren naar matig.- U geeft in de reactie richting de DEC aan dat gestart wordt met groepshuisvesting van de dieren. Zodra geconstateerd wordt dat de dieren aan de canule zullen gaan knagen, dan wordt er overgestapt op individuele huisvesting. Kunt u individuele huisvesting als afwijkende vorm van huisvesten beschrijven en onderbouwen onder C?- Kunt u het ongerief van individuele huisvesting benoemen onder F en meenemen in de ongeriefsclassificatie? <p>Over de NTS:</p> <ul style="list-style-type: none">- In de NTS geeft u aan dat de dieren die na de procedure nog in leven zijn worden hergebruikt. Dit is niet correct omdat alle dieren na de proef worden gedood. Kunt u het hergebruik bij de 126 dieren verwijderen in het tabblad?- Bij vervanging schrijft u dat uw onderzoek niet mogelijk is in ongewervelde dieren, zoals de zebravis. Wij verzoeken u om dit voorbeeld aan te passen aangezien de zebravis een gewervelde diersoort
---------------	--

	is. - In de NTS schrijft u over het 'isoleren van organen'. U gebruikt ook de term 'sympathisch zenuwstelsel'. Hierdoor is de NTS moeilijk navolgbaar voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om technisch taalgebruik in de NTS te vervangen door meer toegankelijke woorden.			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Wistar Kyoto	126	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen

Citaat: De dieren zullen in eerste instantie volgens de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest worden. Zodra geconstateerd wordt dat de dieren aan de canule zullen gaan knagen, dan wordt er overgestapt op individuele huisvesting. De kans dat dit nodig zal zijn wordt op basis van de Instantie van Dierenwelzijn **5.1 lid 2h** op heel klein geschat, omdat er in deze studie gebruikt wordt gemaakt van "vascular access port buttons". Deze buttons voorkomen dat de dieren bij elkaar aan de canules kunnen knagen. Deze buttons blijken in meerdere studies succesvol tegen het knagen aan de canule. Mocht er in een uitzonderlijk geval toch aan de canule geknaagd kunnen worden, dan worden de dieren individueel gehuisvest. Dit wordt gedaan om te voorkomen dat canules beschadigd worden en/of er door het knagen infecties in de canule zullen optreden. Individuele huisvesting zal in dit geval nodig zijn om ongerief voor de dieren te voorkomen, kwaliteit van de studie te waarborgen en onnodige exclusie van een dier uit de studie te voorkomen.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	Het DEC advies is volledig en kan als grondslag dienen voor het besluit. Ethische afweging van de DEC:
-------------------	---

Citaat D:

1. Weegt in het voorgestelde onderzoek naar de cardiovasculaire effecten van "traceamine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt aangedaan?

2. o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: substantieel nadeel (dieren ondergaan ongerief en worden uiteindelijk gedood)

o Waarden die voor de doelgroep (sporters) bevorderd worden: substantieel voordeel (reductie van cardiovasculaire risico's)

o Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: reëel voordeel. De kans dat onderzoekers meer inzicht krijgen in de mogelijke cardiovasculaire effecten van elementen uit voedingssupplementen, en dat onderzoekers hierover kunnen rapporteren aan de NVWA en publiceren is realistisch.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de belangen van gebruikers van prestatiebevorderende voedingssupplementen zwaarder wegen dan de belangen en waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen (voornamelijk een operatie onder anesthesie met aanbrengen van telemetrische sensoren en een permanente canule) en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast vanwege de standaard huisvesting.

3. De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag 'weegt het onderzoek naar de cardiovasculaire effecten van "trace-amine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt aangedaan?' bevestigend.

De **5.1 lid2h** onderschrijft de integriteit en intrinsieke waarde van het dier en heeft oog voor het te ondergane ongerief van de proefdieren. Naar haar mening weegt echter het substantiële belang van dit project, en meer specifiek de (substantiële) belangen van de gebruikers van

voedingssupplementen, zwaarder dan de voorgestelde schending van integriteit, het te berokkenen ongerief en opoffering van de dieren.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de voorgestelde experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals duidelijk uit hun voorstel blijkt. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no-go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De **5.1 lid2h** is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de **5.1 lid2h** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel 'Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen' als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de **5.1 lid2h** het projectvoorstel van een positief advies.

Het is aannemelijk dat de doelstelling (bepaling van mogelijke cardiovasculaire effecten van bepaalde voedingssupplementen) behaald zal worden. De **5.1 lid2h** heeft de onderzoeker wel gevraagd te verklaren dat dit werk niet valt onder 'regulier toxicologisch onderzoek'. Zij hebben verklaard dat dit niet het geval is omdat het hier primair gaat om fysiologisch onderzoek. Onderzoek dat zij goed kunnen uitvoeren vanwege hun specialisatie.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld met de volgende strekking over het belang, de doelstelling, de transleerbaarheid, de 3V's, de strategie, de onderzoeksopzet, het ongerief en de aantallen

	<p>Het DEC advies is Positief</p> <p>Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Citaat: Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies is niet unaniem tot stand gekomen. Eén DEC-lid nam een minderheidsstandpunt in. Sporters zijn een belangrijke uiteindelijke stakeholder in dit project dat gericht is op het bepalen van de veiligheid van sportvoedingssupplementen. Sportvoedingssupplementen die op de markt zijn kunnen onveilig zijn, omdat de veiligheid ervan niet van tevoren vastgesteld hoeft te worden door producenten. In dit onderzoek worden ratten ingezet om deze veiligheid te bepalen. Bescherming van sporters kan echter ook gepromoot worden door weetwat-je-eet-achtige publieke campagnes in plaats van het inzetten van proefdieren. Sporters hebben uiteindelijk een eigen verantwoordelijkheid. In die zin is dit onderzoek maatschappelijk vervangbaar. Op basis hiervan, en gekoppeld aan het matige ongerief voor de dieren, kwam dit DEC-lid tot een negatief advies.</p> <p>De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC: Citaat: Een knelpunt is de vraag of dit soort veiligheidsonderzoek dat (in dit geval) voortkomt uit een NVWA rapport over risico's van nieuwe voedingssupplementen opgepakt moet worden bij een universiteit, ook al hebben ze de wetenschappelijke expertise. Is dat wel een taak voor een universiteit?</p> <p>Een ander knelpunt betrof de vraag hoe het belang van een dierproef ingeschat moet worden dat uiteindelijk ten dienste staat van verhoging van de individuele performance binnen een sport.</p>
--	---

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. U geeft duidelijk weer welke knelpunten u bent tegengekomen tijdens de behandeling van deze aanvraag.</p>
-----------------------------	--

4 Inhoudelijke beoordeling

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat: Directe doel Het directe doel van dit project is om de effecten van "trace-amine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op het sympathisch zenuwstelsel te bestuderen om zo bij te dragen aan de risicobeoordeling en stimulatie van handhaving van deze stoffen. Dit doel zal behaald worden door het voltooien van de volgende subdoelen.</p> <p>Subdoelen Directe sympathomimetische effecten van catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen: op bloeddruk, hartslagfrequentie en hartslagcontractiekracht in vivo in de rat. op vaatcontractiliteit bestuderen (ex vivo) in mesenteriale weerstandsvaten van de rat.</p> <p>Indirecte sympathomimetische effecten van "trace-amine"-achtige stoffen in voedingssupplementen: op bloeddruk, hartslagfrequentie en hartslagcontractiekracht in vivo in de rat bestuderen. op TAAR1 expressie in synaptosomen geïsoleerd uit rat hersenen bestuderen. op dopamine-, noradrenaline- en serotonine transport bestuderen in synaptosomen geïsoleerd uit rat hersenen.</p>
---	--

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Dit project heeft zowel een maatschappelijk als een wetenschappelijk belang. Het onderzoek van Biesterbos et al. (2019) laat zien dat voedingssupplementen gericht op de bevordering van sportprestaties een verscheidenheid aan farmacologisch actieve stoffen kunnen bevatten waarvan onderzoek naar de veiligheid en werkingsmechanismes ontbreekt¹. Meerdere casussen laten zien dat het gebruik van deze voedingssupplementen aanleiding kunnen geven tot ernstige gezondheidsschade zoals een hersenbloeding of een acuut hartinfarct 42–44. Het is van belang voor de maatschappij dat er onderzoek wordt verricht naar de sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen om enerzijds consumenten beter te kunnen informeren om zo ernstige gezondheidsschade zoals deze te voorkomen en anderzijds om de veiligheidsautoriteiten te ondersteunen bij het uitvoeren van risicobeoordelingen waardoor er gehandhaafd kan worden.</p> <p>Daarnaast heeft dit project een wetenschappelijk belang. Dit project zal bijdragen aan de kennisontwikkeling van de werkingsmechanismen van de te onderzoeken stoffen en de translatie van deze mechanismen naar fysiologisch relevante effecten. De lijst met farmacologische actieve stoffen die in voedingssupplementen worden gedetecteerd groeit snel. Dit kan verklaard worden doordat voedingssupplement producenten steeds weer nieuwe stoffen ontwikkelen voor gebruik in hun supplementen, doordat zij kleine chemische aanpassingen doen aan bestaande farmacologisch actieve stoffen waardoor er een nieuwe stof ontstaat en de bestaande regulering wordt omzeild. De te onderzoeken stoffen hebben daarom vergelijkbare moleculaire structuren. Deze chemische modificaties kunnen de effecten op het sympathisch zenuwstelsel veranderen en daarom zullen deze gemodificeerde stoffen uitvoerig worden bestudeerd.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat DEC advies C7: Voor zover de 5.1 lid2h kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de jarenlange ervaring met het opzetten van in vivo dierstudies (de telemetrische afleidingen) en myograafstudies met ratten (de ex vivo studies). Men zal middels dit project de kennis ook overdragen aan junior onderzoekers zodat de kennis behouden blijft binnen het instituut.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

3V's

Vervanging	<p>3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen: Citaat: De in vitro screening met cellijnen die de adrenoreceptoren (α_1, α_2, β_1, β_2) en TAAR1 tot overexpressie brengen, zorgen voor vervanging van ex vivo dierproeven met een groot deel van de te onderzoeken teststoffen. Teststoffen die in deze in vitro screening geen effect vertonen worden niet onderzocht in de ex/in vivo dierstudies, omdat de verwachting is dat bij de afwezigheid van in vitro effecten er ook geen ex vivo effecten gemeten gaan worden. Ook stoffen met milde in vitro effecten ($EC_{50} > 10 \mu M$ en $E_{max} < 70\%$) worden niet verder bestudeerd in de dierstudies.</p> <p>Momenteel is het nog niet mogelijk om sympathomimetische effecten van deze stoffen in mensen te onderzoeken. Om een duidelijk beeld te krijgen van het verloop van eventuele effecten worden hartslagfrequentie, hartcontractiekracht en bloeddruk continu gemonitord (telemetrie). Continue meting van bloeddruk is in mensen alleen mogelijk door de inbreng van een arteriële canule 13. Het inbrengen van een arteriële canule is een te invasieve procedure voor humane studies. Daarom is nog niet mogelijk deze dierstudie te vervangen door een humane in vivo studie.</p>
Verminderen	<p>3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen: Citaat: De in vitro receptoractivatie studies zorgen ook voor vermindering in het aantal benodigde dieren voor de in vivo en ex vivo dierproeven. Stoffen die in vitro geen effecten vertonen worden niet meegenomen in de in/ex vivo dierstudies, waardoor het aantal benodigde dieren afneemt. Door het gebruik van wash-outperiodes in de in vivo studie kunnen er meerdere stoffen in één dier worden bestudeerd, wat ook zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren.</p> <p>Daarnaast zullen er zoveel als mogelijk mesenteriale vaten uit één dier geïsoleerd worden, waardoor er meerdere teststoffen tegelijkertijd bestudeerd kunnen worden en er uiteindelijk minder dieren nodig zijn om effecten van alle stoffen te bestuderen.</p> <p>Ook geeft de powerberekening aan wat het minimaal aantal benodigde dieren is om effecten te kunnen waarnemen.</p>

Verfijnen	<p>3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen: Citaat: Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en succesvoller geïsoleerd kunnen. Doordat de isolaties sneller plaats kunnen vinden dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere vaten te isoleren uit het mesenterium van de rat. Dit zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren en ook voor verfijning van de dierproeven doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden.</p> <p>Daarnaast zijn de proeven verfijnd door meerdere organen/weefsels uit één dier te isoleren. De proeven met de mesenteriale vaten horen met vers geïsoleerde organen uitgevoerd te worden 7,9.</p> <p>De ingebouwde telemetriezendes kunnen bloeddruk, hartslagfrequentie, hartcontractiekracht en lichaamstemperatuur continu meten. Dit zorgt ook voor verfijning van de proef, omdat er gemonitord kan worden of deze parameters bij de dieren op gezonde niveaus zijn (buiten de experimenten met toediening van mogelijk sympathomimetische stoffen om). Ook verfijnen de telemetriezendes de dierproef, doordat er geen extra handelingen met de dieren uitgevoerd hoeven te worden tijdens de blootstellingen aan de teststoffen. De dieren worden op die momenten met rust gelaten.</p> <p>Daarnaast worden zowel de dieren als de uitvoerders getraind voor het flushen van de canule, waardoor de proef ook verfijnd wordt. Hierdoor wordt de kans kleiner dat canules verstopt raken en dieren hier eventueel ongemak van ondervinden.</p>
<p>3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen: De 3V's zijn voldoende onderbouwd.</p>	

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen	HEP: 20%	<p>Citaat: Er zijn 2 fases in het project waarbij de humane eindpunten verschillend worden gehanteerd: 1 . In de post-operatieve periode: Humane eindpunten worden gehanteerd indien er complicaties optreden na de operatie met afwijkingen van verwacht herstel.</p> <p>Deze worden gebaseerd op:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gewichtsverlies: In de eerste dagen na de operatie kan er gewichtsverlies optreden als gevolg van de operatie en de toegediende opiaten. Dit gewichtsverlies is tijdelijk van aard. Na enkele dagen herstelt het gewichtsverlies. Er wordt bij beoordeling van gewichtsverlies rekening gehouden met het gewicht van het implantaat. Indien het gewichtsverlies niet herstelt na enkele dagen zoals verwacht wordt (progressief gewichtsverlies) of er meer dan 15% gewichtsverlies optreedt, wordt het dier uit experiment gehaald. - Klinische symptomen: de eerste dagen na de operatie kunnen dieren zich ziek voelen of buikpijn hebben. Dit kan leiden tot verminderde activiteit, porfyrie, minder verzorgde vacht, verminderde eetlust en tekenen van buikpijn (back-arch, twist, wincing, whrite, gelaatsuitdrukking indicatief voor pijn). De dieren krijgen pijnstilling en post-operatieve zorg. Humane eindpunten worden toegepast indien er <ul style="list-style-type: none"> o obstipatie optreedt tgv ileus, o dieren geen progressief herstel van de operatie vertonen o abdominale hernia wordt vastgesteld o Geen verbetering van pijnsymptomen optreden ondanks pijnstilling

		<p>o er een indicatie is voor sepsis</p> <p>o een infectie optreedt ten gevolge van de canule en/of telemetrieoperatie die niet behandelbaar is.</p> <p>o tekenen van inwendige bloeding in de post-operatieve periode</p> <p>- Technische eindpunten: niet functioneren van de telemetriezender of verstopte canule.</p> <p>2. in de testperiode: Na herstel van de operatie worden er humane eindpunten gehanteerd. Deze worden gebaseerd op:</p> <p>- Het optreden van bijwerkingen ten gevolge van de testsubstanties: Ten gevolge van het toedienen van de teststoffen kunnen er tijdelijke veranderingen optreden in cardiovasculaire parameters en tijdelijke veranderingen in gedrag. Indien deze niet van voorbijgaande aard zijn of niet corrigeerbaar wordt het dier uit experiment genomen. Humane eindpunten zijn gebaseerd op telemetrie data in combinatie met klinische symptomen gebaseerd op onder andere bewustzijn, activiteit, houding, gedrag, interactie met kooigenoten, lichaamsconditie, gang en gewicht. Bij gewichtsverlies van meer dan 15% of klinische symptomen die indicatief zijn voor matig ongerief wordt een dier uit experiment gehaald. Er wordt een welzijnsscoringslijst opgesteld en afgestemd met de IvD. Wanneer de toename in bloeddruk meer dan 50 mmHg is en wanneer de hartslagfrequentie meer dan 100 slagen/minuut toeneemt, worden er humane eindpunten gehanteerd.</p> <p>- Technische eindpunten: niet functioneren van de telemetriezender of verstopte canule.</p>
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Het uitgebrachte DEC advies is niet unaniem tot stand gekomen. Eén DEC lid heeft een minderheidsstandpunt ingenomen. Deze vindt dat het onderzoek maatschappelijk vervangbaar is, door de inzet van publieke campagnes in

plaats van proefdieren. 5.2 lid1

Het Secretariaat heeft de aanvrager vragen gesteld over het ongerief, de huisvesting en de Niet-technische Samenvatting.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

5.2 lid1

5.2 lid1

5.2 lid1

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 18 november 2022 10:21
Aan: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202216336

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 17-08-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216336. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

- In de NTS geeft u aan dat de dieren die na de procedure nog in leven zijn worden hergebruikt. Dit is niet correct omdat alle dieren na de proef worden gedood. Kunt u het hergebruik bij de 126 dieren verwijderen in het tabblad?
- Bij vervanging schrijft u dat uw onderzoek niet mogelijk is in ongewervelde dieren, zoals de zebravis. Wij verzoeken u om dit voorbeeld aan te passen aangezien de zebravis een gewervelde diersoort is.
- In de NTS schrijft u over het 'isoleren van organen'. U gebruikt ook de term 'sympathisch zenuwstelsel'. Hierdoor is de NTS moeilijk navolgbaar voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om technisch taalgebruik in de NTS te vervangen door meer toegankelijke woorden.

Onduidelijkheden

- In de bijlage dierproeven geeft u aan dat de dieren door de operatie om telemetrie zenders en de canule in de dieren te plaatsen matig ongerief ondergaan. Als afsluitende zin geeft u onder F aan dat 100% van de dieren cumulatief mild ongerief zal ondergaan. Als er matig ongerief plaats vindt, kan het cumulatief ongerief niet licht zijn. Kunt u het ongerief in de laatste zin corrigeren naar matig.
- U geeft in de reactie richting de DEC aan dat gestart wordt met groepshuisvesting van de dieren. Zodra geconstateerd wordt dat de dieren aan de canule zullen gaan knagen, dan wordt er overgestapt op individuele huisvesting. Kunt u individuele huisvesting als afwijkende vorm van huisvesten beschrijven en onderbouwen onder C?
- Kunt u het ongerief van individuele huisvesting benoemen onder F en meenemen in de ongeriefsclassificatie?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

In principe heeft u 14 dagen de tijd om op deze vragen te reageren. Als u echter uiterlijk 24 november op deze vragen kunt reageren, kunnen uw antwoorden in de eerstvolgende CCD vergadering van 25 november worden ingebracht bij de

bespreking van uw aanvraag.

Wanneer een beslissing

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

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Opmerkingen bij NTS

Door: 5.1 lid2e , 5.1 lid2h

Algemene opmerkingen en suggesties:

De richtlijn zegt dat je de NTS schrijft voor "het brede publiek". Voor overheidsinstanties betekent dat schrijfniveau B1, dat wil zeggen iemand die HAVO heeft afgerond. Het beste kun je iemand in gedachten nemen die een totaal ander vak dan jij doet, maar die wel geïnteresseerd is (familie, burens, vrienden). Doe net of je die persoon moet uitleggen waarom deze dierproef belangrijk is. Vermijd dus jargon zoals medische termen voor diagnoses, ingrepen of procedures die niet in de volksmond worden gebruikt. Hetzelfde geldt voor terminologie die in vooral in wetenschappelijk onderzoek wordt gebruikt. Gebruik eenvoudige spreektaal of leg begrippen in leekentaal uit.

Ik heb suggesties gedaan in de tekst of in de opmerkingen. Mocht je nog vragen hebben kan je altijd contact opnemen via: 5.1 lid2e

Title

Testen van de veiligheid van stoffen in voedingssupplementen voor mensen bij ratten

Objectives of the project

Op de Nederlandse markt zijn voedingssupplementen te koop die mensen nemen voor, tijdens of na het sporten. In deze supplementen zijn stoffen gevonden waarvan de veiligheid voor de mens niet onderzocht is. Deze stoffen lijken op stoffen die het onvrijwillige zenuwstelsel kunnen activeren. Activering van dit zenuwstelsel zorgt voor een toename in bloeddruk, hartslagsnelheid en sterkte van de hartslag. Het is echter niet bekend of de gevonden stoffen hiervoor kunnen zorgen. Ook is het niet bekend of deze stoffen giftig kunnen zijn voor de mens. Daarom is het doel van dit onderzoek om te onderzoeken of deze stoffen het onvrijwillige zenuwstelsel kunnen activeren en of deze stoffen giftig kunnen zijn voor de mens. Op deze manier kan er gekeken worden of deze supplementen veilig zijn en of ze eventueel verboden moeten worden.

Potential benefits

Het is van belang voor de maatschappij dat er onderzoek wordt gedaan naar de effecten op het onvrijwillige zenuwstelsel van deze stoffen in voedingssupplementen. Zo kunnen consumenten beter ingelicht worden over de veiligheid van deze supplementen. Als de stoffen inderdaad gevaarlijk blijken, geeft dit aanleiding om de stoffen te verbieden. Zo kan mogelijk ernstige gezondheidsschade (bijv. hartaanval, hersenbloeding, sterfte) voorkomen worden. Het is bekend dat een te grote activering van het onvrijwillige zenuwstelsel kan leiden tot ernstige gezondheidsschade zoals hartaanval, hersenbloeding en sterfte. Ook wordt de wetenschap met de uitkomsten van dit project voorruit geholpen. Dit project zorgt namelijk voor meer kennis over de werking van de te onderzoeken stoffen en stoffen die hierop lijken.

Predicted harms

In what procedures will the animals be used?

Ratten zullen 1 operatie (onder narcose) ondergaan (max. 2 uur) voor de plaatsing van draadloze zenders in de buik en voor plaatsing van een hol buisje in een bloedvat, waar later het infuus aan verbonden kan worden. Zij krijgen in totaal maximaal 5 keer op verschillende dagen een teststof via een infuus (max. 4 uur). Omdat de hersenen na doding van het dier nodig zijn om effecten van de teststoffen op de hersenen te onderzoeken, wordt het dier gedood door onthoofding. Na overlijden worden bloedvaten en hersenen uit het lichaam gehaald. Deze organen worden gebruikt om verder te onderzoeken buiten het lichaam.

Expected impact

Na de operatie kunnen de dieren matige pijn en/of stress ervaren. Zij zullen minimaal twee weken nodig hebben om te herstellen. De teststoffen kunnen de bloeddruk, ademhaling en hartslag van de dieren veranderen. Dit zal van korte duur zijn (max. 4 uur).

Reasons for planned fate

Nadat de dieren zijn gedood, kunnen de effecten van actieve stoffen in voedingssupplementen op bloedvatvernauwing en -verwijding en hersencelfunctie bestudeerd worden buiten het lichaam van de dieren. Het gebruik van deze methodes buiten het lichaam van het dier zorgen ervoor dat de dieren geen nadelige bijwerkingen zullen ondervinden.

Three R's

1 Replacement

Andere methoden om effecten op hartslag (snelheid en kracht) te bestuderen zijn studies met cellen in het lab (zonder dat er levende mensen of dieren aan te pas komen). Daarom testen we de stoffen eerst in cellen die betrokken zijn bij vaatvernauwing, vaatverwijding, hartslagsnelheid en -kracht. Stoffen die geen effecten laten zien op deze cellen, worden niet onderzocht in de dieren. Voor die stoffen hoeven dus geen ratten te worden gebruikt. Vervangen van de dierproef in zijn geheel is niet mogelijk, omdat het onvrijwillige zenuwstelsel uit meerdere organen bestaat en de invloed van de verschillende organen op elkaar niet is na te bootsen buiten het lichaam. Het onderzoek kan niet in mensen uitgevoerd worden, omdat voor de bloeddruk en hartslag (snelheid en kracht) continu gemeten moet worden. Hiervoor moet apparatuur in het bloedvat ingebracht worden, wat een ingrijpende procedure is voor mensen. Ook is het niet mogelijk dit onderzoek in ongewervelde diersoorten, uit te voeren omdat bloeddruk en hartslag in deze dieren moeilijker te meten is dan in zoogdieren. Daarnaast zijn de verschillen van de receptoren in het onvrijwillige zenuwstelsel tussen mens en ongewervelde diersoorten groter dan tussen mens en rat, waardoor de resultaten van de rat beter laten zien wat het effect van de stoffen op de mens zouden zijn.

2 Reduction

Om zo min mogelijk dieren te gebruiken wordt het aantal dieren dat nodig is in dit project bepaald met behulp van een statistische berekening. Er zullen niet meer dieren worden gebruikt dan nodig zijn voor betrouwbare resultaten.

De eerdergenoemde test van de stoffen op cellen zonder dat er mensen of dieren aan te pas komen, zorgt ook voor vermindering in het aantal benodigde dieren voor de dierproeven. Stoffen die in de cellen geen effecten vertonen, worden niet getest op dieren, waardoor het aantal dieren dat nodig is afneemt. Er zullen meerdere teststoffen in 1 dier bestudeerd worden, om zo het aantal dieren dat nodig is te verminderen. Daarnaast zullen er zoveel als mogelijk bloedvaten uit één dier gehaald worden, waardoor er meerdere teststoffen tegelijkertijd bestudeerd kunnen worden en er uiteindelijk minder dieren nodig zijn om effecten van alle stoffen te bestuderen.

3 Refinement

Het ongemak wordt zo minimaal mogelijk gemaakt door dieren voor de operatie pijnstilling te geven en ze veel tijd te geven om te herstellen. Ook na de operatie zullen zij pijnstilling krijgen. De ingebrachte meetapparatuur zorgt ook voor verfijning van de proef, omdat er continu gemonitord kan worden of de bloeddruk, hartslag (snelheid en kracht) en lichaamstemperatuur bij de dieren op gezonde niveaus zijn (buiten de tests met de stoffen om). Ook hoeven er zo geen extra handelingen

met de dieren uitgevoerd te worden tijdens het onderzoek. De dieren worden op die momenten met rust gelaten.

Explain the choice of species

Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en **succesvoller uit het lichaam gehaald kunnen worden**. **Doordat dit sneller kan** dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere bloedvaten **uit de rat te halen**. Dit zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden.

Er is gekozen voor ratten, omdat zij een normale bloeddruk hebben en veelvuldig gebruikt worden als controlemodel voor onderzoek naar het hart- en vaatstelsel. De keuze gaat uit naar volwassen dieren om zo de gebruikersgroep van de voedingssupplementen gericht op sportprestaties in de samenleving na te bootsen.

H
et
af
be
el
di
ng
on
de
rd

Het afbeeldingonderdeel met relatie-id rId1 is niet aangetroffen in het bestand.

14



Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
1	Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Pilot studies

In dit onderzoek worden een aantal technieken toegepast waarvan het van groot belang is dat onderzoekers deze goed beheersen. Hiervoor is opleiding en training vereist, wat middels pilotstudies zal worden verworven. Gedurende pilotstudies worden onderzoekers opgeleid voor de volgende technieken: (1) het plaatsen van de telemetrieapparatuur in de dieren, (2) het aanbrengen van permanente canules, (3) isolaties van mesenteriale vaten en hersenweefsel, (4) het plaatsen van mesenteriale vaten in een functionerende myograafopstelling en (5) optimalisatie van het synaptosoom bereidingsprotocol. De vakgroep heeft de kennis in huis om deze onderzoekers op te leiden voor de bovenstaande technieken. De pilotstudie voorafgaande aan de *in vivo* studie is afgerond indien telemetriezenders en permanente canules succesvol zijn geplaatst en de dieren hersteld zijn van deze operatie. Hoe succesvolle plaatsing en succesvol herstel gemeten wordt, zal in samenspraak met de Instantie voor Dierenwelzijn (IvD) afgestemd worden in het werkprotocol. Het andere criterium om verder te mogen naar de *in vivo* studies voor dataverzameling is dat er significante verschillen in de uitleesparameters te zien moeten zijn na toediening van de controlestof adrenaline. De primaire uitleesparameters om sympathomimetische effecten te kunnen bestuderen in de *in vivo* studies zijn: (1)

hartslagfrequentie, (2) contractiekracht van het hart, (3) bloeddruk en (4) lichaamstemperatuur. Er zijn geen secundaire uitleesparameters.

In vivo studies

De *in vivo* studies starten met een operatie om de telemetrie apparatuur in de dieren in te brengen. Na een herstelperiode van minimaal twee weken wordt het dier intraveneus blootgesteld aan de laagste dosis van een teststof. Voorafgaand hierop zal eerst nog een vehicle controle toegediend worden en de ED50 van de positieve controle adrenaline (om de functie van het sympathisch zenuwstelsel te testen). Met draadloze telemetrie-zenders worden effecten op het sympathisch zenuwstelsel gemeten. Dit zijn: bloeddruk, hartslagfrequentie, hartslagcontractiekracht (inotropie) en lichaamstemperatuur. Indien er een effect optreedt en dit effect stabiliseert, dan wordt een volgende, hogere, dosis van de concentratiereeks toegediend. Indien er bij de laagste concentratie geen effect optreedt, zal er overgegaan worden op de volgende dosis in de reeks. De verwachting is dat de effecten na i.v. toediening binnen 5 à 20 minuten zullen optreden. Hierbij is een marge ingebouwd en wordt er maximaal 30 minuten gewacht om een effect te observeren. Indien er na 30 minuten geen effect geobserveerd wordt, wordt een hogere dosering toegediend. Er zullen 8 doseringen toegediend worden om dosis-response relaties te kunnen vaststellen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van half-logaritmische doseringen. Na de hoogste dosering van een teststof zal opnieuw de ED50 van adrenaline toegediend worden als controle. Nadat dit voor de eerste teststof gedaan is, vindt er een wash-outperiode plaats. Om er zeker van te zijn dat de teststof en eventuele metabolieten geklaard zijn, en om dieren ruim de tijd te geven om te herstellen is gekozen voor een periode van minimaal één week. Indien de dieren geen bijwerkingen van de teststof ondervinden en hersteld zijn, zal na één week een tweede teststof toegediend worden op dezelfde manier als dit voor de eerste teststof gedaan is. Er wordt ernaar gestreefd om dieren zoveel als mogelijk her te gebruiken (met een maximum van 5 teststoffen per dier, met de wash-outperiodes tussen de verschillende teststoffen). Na de laatste wash-out periode worden de dieren opgeofferd middels decapitatie en wordt overgegaan op de *ex vivo* studies. De tijdslijn van de procedures die een dier ondergaan staat beschreven in Figuur 1 op de volgende bladzijde.

Ex vivo studies

Voor de synaptosomale (*in vitro*) incubaties met geïsoleerd hersenweefsel zijn de uitleesparameters: (1) expressie van (gefosforyleerde) transporters en receptoren van catecholamines en trace amines en (2) de effecten van de teststoffen op heropname van catecholamines en trace amines. Gen- en eiwitexpressie van transporters en receptoren zal gemeten worden met moleculaire technieken zoals qPCR en Western blot analyse. Catecholamines en trace amines worden gekwantificeerd met chemisch analytische methodes zoals vloeistofchromatografie-massaspectrometrie. Deze studies zijn van belang om de selectie van teststoffen die agonistische- of antagonistische effecten vertonen in de voorafgaande *in vitro* studies te bestuderen in een fysiologisch relevanter onderzoeksmodel dan de eerder uitgevoerde *in vitro* receptoractivatie studies. De uitleesparameters van deze studies zeggen iets over de indirecte sympathomimetische effecten van de (ongereguleerde) teststoffen aanwezig in voedingssupplementen. In de pilotstudies wordt het protocol voor bereiding van synaptosomen geoptimaliseerd en dient de controlestof tyramine significantie verschillen te laten zien in catecholamineconcentraties.

Uitleesparameters voor de *ex vivo* studies met de mesenteriale weerstandsvaten zijn vasoconstrictie en vasodilatatie, welke met een *small vessel* myograaf gemeten gaan worden. Deze uitleesparameters zijn van belang om de effecten van eerder *in vitro* aangetoonde adrenoreceptoragonisten en -antagonisten op orgaanfunctie te bestuderen. Voordat de teststoffen in dit model bestudeerd worden, worden er pilot/controlestudies uitgevoerd. Criteria om de teststoffen in het model te testen zijn: (1) intact endotheel (relaxatietest met acetylcholine) en (2) receptoronafhankelijke werking van de vasculaire gladde spiercellen (depolarisatietest met kalium).

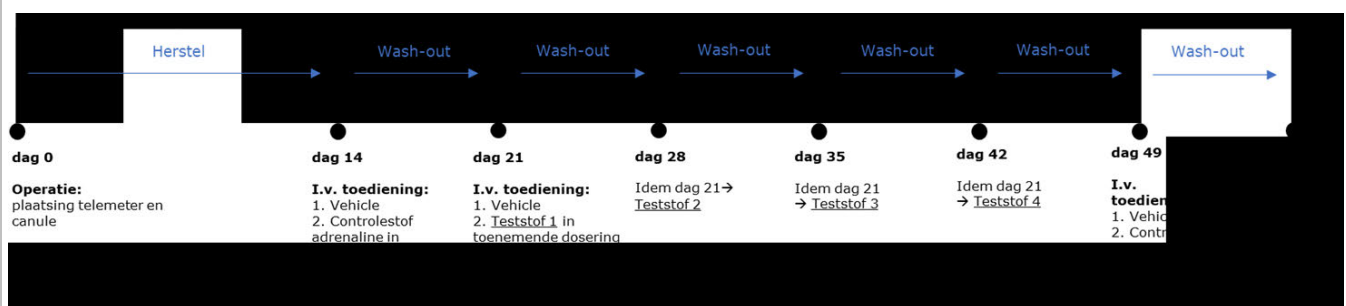
Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Na afronding van de pilotstudies wordt er overgegaan op de *in vivo* studies waarbij de dieren blootgesteld zullen worden aan de teststoffen. Een overzicht van het tijdsverloop is weergegeven in Figuur 1. Telemetrie-zenders en permanente canules worden in de dieren geplaatst. Deze operatie gebeurt onder narcose. Om de pijn centraal te verdoven, wordt een opiaat toegediend. Daarnaast wordt een NSAID

toegediend tegen perifere pijn en ontstekingen. Na deze operatie hebben de dieren minimaal twee weken nodig om te herstellen. Om er zeker van te zijn dat de hersteltijd lang genoeg is, is er gekozen voor een hersteltijd van twee weken. Na de herstelperiode worden de wakkere dieren (om TAAR1-gemedieerde effecten niet uit te sluiten) **aan de controlestof adrenaline intraveneus blootgesteld**. Er wordt gestart met toediening van een vehicle controle. Hierna wordt de laagste concentratie van de adrenaline toegediend. Na stabilisatie van eventuele effecten wordt een volgende, iets hogere, concentratie toegediend. Dit wordt weer gevolgd door een periode voor het stabiliseren van de effecten en een volgende hogere concentratie. Op deze manier kan er een dosis-response relatie verkregen worden **van de controlestof adrenaline** (maximaal 8 doseringen). Naar verwachting zal stabilisatie van effecten binnen enkele minuten tot een uur optreden. Na toediening van de hoogste concentratie en meting van de daaropvolgende effecten, gaat er een wash-outperiode van één week van start. Hierna zal de eerste teststof op eenzelfde manier als de controlestof toegediend worden (eerst toediening van de vehicle, dan toediening van de laagste dosering van de teststof, gevolgd door toenemende doseringen van de teststof, in totaal maximaal 8 doseringen). In het project zullen er in de *in vivo* studies maximaal 10 teststoffen bestudeerd worden. Ieder dier zal aan maximaal vier teststoffen blootgesteld worden (met daartussen de wash-periode van één week). **Één week voor toediening van de eerste teststof wordt de controlestof adrenaline in toenemende doseringen toegediend. Dit wordt herhaald één week na toediening van de vierde teststof (zie Figuur 1).**

Hoewel de klaringssnelheid van de meeste stoffen onbekend is, is er voor de bepaling van de wash-outperiode gekeken naar gegevens van de vergelijkbare stof methamfetamine. De halfwaardetijd van methamfetamine is ongeveer 70 minuten in ratten na iv-toediening¹. Deze stof zal na ongeveer 280 minuten helemaal geklaard zijn (70 maal omrekeningsfactor 4 = 280 minuten). Om er zeker van te zijn dat metabolieten ook geklaard zijn en om de dieren ruim tijd te geven om te herstellen van mogelijke effecten, is er gekozen voor een ruime wash-out periode van één week. Ook vanuit praktisch oogpunt geeft dit de onderzoekers voldoende tijd om alle studies goed te kunnen uitvoeren en voor te bereiden.

Na toediening **van de controle stof adrenaline na toediening van de vier teststoffen** gaat de laatste wash-outperiode van één week van start. Hierna zullen de dieren opgeofferd worden middels decapitatie, waarna hersenweefsel geïsoleerd wordt voor bereiding van de synaptosomen en de darmen met het mesenterium uit het dier gehaald worden voor isolatie van de mesenteriale vaten. Er zullen maximaal tien stoffen getest worden in de twee *ex vivo* modellen.



Figuur 1 – Tijdslijn van de proefopzet per dier

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

Om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken worden de dieren na blootstelling aan een teststof en na de wash-outperiode hergebruikt voor de bestudering van andere teststoffen. In totaal worden er **4 teststoffen** in een dier bestudeerd **en twee keer de controlestof adrenaline (zie Figuur 1)**. Ook wordt het aantal benodigde dieren beperkt door de prioritering gevolgd op de literatuur- en *in vitro* studies.

Het minimaal aantal benodigde dieren wordt bepaald met een powerberekening (alfa = 0.05 en power = 0.8) voor de vier uitleesparameters van de *in vivo* studies (hartslagfrequentie, contractiekracht van het hart, bloeddruk en lichaamstemperatuur). Deze aantallen zijn ook genoeg voor de *ex vivo* studies aangezien er

meerdere mesenteriale vaten uit één dier geïsoleerd worden en er meerdere aliquots synaptosomen van het brein van één dier gemaakt kunnen worden. Ook zal een drop-outberekening toegepast worden om rekening te houden met eventueel uitval van dieren. Wanneer de i.v. canule waardoor de teststoffen worden toegediend langer dan 5 weken wordt gebruikt, neemt het risico op uitval toe^{2,3}. Op basis van de ervaring die 5.1 lid2h heeft met het uitvoeren van studies met i.v. canules wordt een uitval van ongeveer 20% van de dieren verwacht.

Rekening houdend met bovenstaande zijn naar schatting maximaal 80 dieren nodig voor dit project. Het aantal dieren is als volgt berekend: er zullen maximaal 10 teststoffen bestudeerd worden met een n=8. Er zullen dus 80 metingen zijn per teststof. Als er uitgegaan wordt van het worst-case scenario, dat er per dier slechts 1 stof gemeten kan worden, dan zijn er 80 dieren nodig voor de n=8 van de 10 teststoffen. Hiervan wordt voor 20% (16 dieren) uitval verwacht. In dat geval blijven er 64 dieren over met de intentie om hierin 5 stoffen per dier te onderzoeken. Daarnaast zullen er maximaal 20 dieren nodig zijn voor het trainen van twee onderzoekers voor de *ex vivo* en *in vivo* studies.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Rat	Dieren gefokt voor onderzoek (Charles River)	Volwassen (12 weken)	126	mannelijk en vrouwelijk	nee	Wistar Kyoto

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en succesvoller geïsoleerd kunnen. Doordat de isolaties sneller plaats kunnen vinden dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere vaten te isoleren uit het mesenterium van de rat. Dit zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren en ook voor verfijning van de dierproeven doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden. Het gebruik van lagere diersoorten, zoals de zebravis, is hier uitgesloten vanwege de uitleesparameters die in deze studie bestudeerd zullen worden. Het is niet mogelijk de uitleesparameters in deze lagere diersoorten te kwantificeren.
Herkomst	Er is gekozen voor dieren gefokt voor onderzoeksdoeleinden door erkende fokkers, om de uitleesparameters in een uniforme groep dieren te kunnen bestuderen.
Levensstadia	De keuze gaat uit naar volwassen dieren om zo de gebruikersgroep van voedingssupplementen in de samenleving na te bootsen ⁴ .
Aantal	Het aantal dieren is gebaseerd op de powercalculatie en de drop-outberekening die in het werkprotocol beschreven worden. Er zijn maximaal 88 ratten nodig om alle stoffen (max. 10 + 1 controlestof) 8 keer (n=8) in een dier te testen. Voor dit aantal wordt er uitgegaan van het worstcasescenario waarbij er slechts één stof in één dier getest kan worden. Het streven is echter om maximaal 5 stoffen (4 teststoffen + 1 controlestof) in een dier te testen, indien er geen bijwerkingen van de behandelingen optreden, waardoor de verwachting is dat niet alle dieren nodig zullen zijn. De verwachting is dat de uitval maximaal 20% zal zijn (18

ratten). In dat geval zijn er 106 dieren met de intentie om hierin 4 teststoffen en controlestof adrenaline per dier te onderzoeken. Dan kunnen er in het meest gunstige scenario 530 condities onderzocht worden ($106 \times 5 = 530$), wat betekent dat iedere teststof 48 keer bestudeerd kan worden ($530 \text{ condities} / 11 \text{ stoffen} = 48,2$ herhalingen per stof). Er zijn echter maar 8 herhalingen per stof nodig ($n=8$), wat aangeeft dat waarschijnlijk niet alle dieren nodig zullen zijn om deze studie uit te voeren, uitgaande van een gunstig scenario. In het werkprotocol zal dit verder toegelicht worden middels de powerberekening. Daarnaast zijn er maximaal 20 ratten nodig voor de pilotstudies om twee onderzoekers op te leiden voor de uitvoering van de experimentele procedures. Dit is geschat op basis van de ervaring die 5.1 lid 2h heeft met dit soort studies en het inwerken van de onderzoekers op de benodigde technieken.

Totaal aantal dieren: $88 + 18 + 20 = 126$ dieren. (88 dieren om alle stoffen 8 keer in een dier te kunnen meten; 18 dieren om te compenseren voor de maximaal te verwachten drop-out van 20%; 20 dieren voor de pilotstudies en het trainen van de onderzoekers.

Statistiek: Er wordt voor alle uitleesparameters uitgegaan van een effectgrootte van 20%. Dit komt ongeveer overeen met de toename in de uitleesparameters wanneer een individu zich inspant (ten opzichte van de uitleesparameters in rusttoestand). Bijvoorbeeld, in de studie van Cornelissen et al. (2010) wordt er in de mens een hartslagfrequentie van 71.2 slagen/ minuut gemeten in rusttoestand. Gedurende lage inspanning is de hartslagfrequentie 97.5 slagen/ minuut. Dit is een toename in effect van ongeveer 27%.

De variantie die ten grondslag ligt aan de $n=8$ en de effectgrootte van 20% is 9%. Dit is onder andere gebaseerd op de standaarddeviaties van basale systolische bloeddrukmetingen in eerdere studies met volwassen WKY ratten ^{15, 16, 17}.

In de powercalculatie in het werkprotocol zal dit verder toegelicht worden.

Geslacht	N.v.t. – De keuze gaat uit naar ratten van zowel het mannelijke als het vrouwelijke geslacht om zo de gebruikersgroep van de voedingssupplementen in de samenleving na te bootsen. Er zijn echter wel verschillen in cardiovasculaire regulatie door het sympathisch zenuwstelsel ⁵ , daarom zijn er in deze studie extra dieren nodig om interferentie van effecten van geslachtsverschillen uit te sluiten.
Genetisch gewijzigd	N.v.t.
Stam	Er is gekozen voor Wistar Kyoto ratten, omdat zij een normale bloeddruk hebben en veelvuldig gebruikt worden als controlemodel voor onderzoek naar het cardiovasculaire systeem ⁶⁻⁸ . Referenties De referenties zijn beschreven op de laatste bladzijde van dit document.

C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

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

De dieren zullen in eerste instantie volgens de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest worden. Zodra geconstateerd wordt dat de dieren aan de canule zullen gaan knagen, dan wordt er overgestapt op individuele huisvesting. De kans dat dit nodig zal zijn wordt op basis van de Instantie van Dierenwelzijn

5.1 lid2h op heel klein geschat, omdat er in deze studie gebruikt wordt gemaakt van "vascular access port buttons". Deze buttons voorkomen dat de dieren bij elkaar aan de canules kunnen knagen. Deze buttons blijken in meerdere studies succesvol tegen het knagen aan de canule. Mocht er in een uitzonderlijk geval toch aan de canule geknaagd kunnen worden, dan worden de dieren individueel gehuisvest. Dit wordt gedaan om te voorkomen dat canules beschadigd worden en/of er door het knagen infecties in de canule zullen optreden. Individuele huisvesting zal in dit geval nodig zijn om ongerief voor de dieren te voorkomen, kwaliteit van de studie te waarborgen en onnodige exclusie van een dier uit de studie te voorkomen.

D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voor het inbrengen van de telemetrieapparatuur en de canule wordt een opiaat gegeven om de pijn centraal te verdoven. Er wordt een NSAID gegeven als perifere pijnstiller en ontstekingsremmer.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De dieren kunnen eventueel stress ervaren. Het welzijn kan mogelijk ook aangetast worden door een infectie via de canule. Daarnaast kunnen de teststoffen het welzijn eventueel tijdelijk aantasten, bijvoorbeeld door verhoogde hartslag, bloeddruk of door stemmingsverandering.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De dieren kunnen mogelijk stress ervaren wanneer zij uit hun kooi worden gehaald en overgeplaatst worden naar de plaats voor de levensbeëindiging. Een andere stressfactor kan de i.v. toediening van de teststoffen zijn. Daarnaast is het doel van dit onderzoek om de sympathomimetische effecten van een aantal teststoffen te bestuderen. Dieren kunnen dus eventueel ook ongemak ervaren doordat het sympathisch zenuwstelsel is geactiveerd met gevolgen zoals een onrustig gevoel, verhoogde hartslag, verhoogde bloeddruk.

Een infectie kan eventueel ontstaan als gevolg van het plaatsen van de telemetrieapparatuur en de canule, of bij toediening van de teststoffen via de canule.

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

De dieren worden gehanteerd door ervaren werknemers, die door hun ervaring in het omgaan met proefdieren weten hoe eventuele stress zoveel als mogelijk vermeden wordt. Dieren worden getraind om te wennen aan de experimentele handelingen.

Om mogelijke infecties te voorkomen zal er aseptisch gewerkt worden en wordt er een "vascular access port button" op de vascular access port geplaatst. Indien er bijwerkingen van de te testen stoffen worden vastgesteld met uitgesproken cardiovasculaire effecten zoals bv ritmestoornissen of hypo- of hypertensie die niet transient of corrigeerbaar zijn wordt het experiment voor het dier beëindigd. Wanneer dit optreedt, zal eerst de toediening van teststof gestopt worden. Wanneer er dan na 30 minuten nog geen verbetering is in de cardiovasculaire homeostase, dan wordt het experiment beëindigd en zal het dier opgeofferd worden.

E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Er zijn 2 fases in het project waarbij de humane eindpunten verschillend worden gehanteerd:

1 . In de post-operatieve periode:

Humane eindpunten worden gehanteerd indien er complicaties optreden na de operatie met afwijkingen van verwacht herstel.

Deze worden gebaseerd op:

- Gewichtsverlies: In de eerste dagen na de operatie kan er gewichtsverlies optreden als gevolg van de operatie en de toegediende opiaten. Dit gewichtsverlies is tijdelijk van aard. Na enkele dagen herstelt het gewichtsverlies. Er wordt bij beoordeling van gewichtsverlies rekening gehouden met het gewicht van het implantaat. Indien het gewichtsverlies niet herstelt na enkele dagen zoals verwacht wordt (progressief gewichtsverlies) of er meer dan 15% gewichtsverlies optreedt, wordt het dier uit experiment gehaald.
- Klinische symptomen: de eerste dagen na de operatie kunnen dieren zich ziek voelen of buikpijn hebben. Dit kan leiden tot verminderde activiteit, porfyrie, minder verzorgde vacht, verminderde eetlust en tekenen van buikpijn (back-arch, twist, wincing, whrite, gelaatsuitdrukking indicatief voor pijn). De dieren krijgen pijnstilling en post-operatieve zorg. Humane eindpunten worden toegepast indien er
 - o obstipatie optreedt tgv ileus,
 - o dieren geen progressief herstel van de operatie vertonen
 - o abdominale hernia wordt vastgesteld
 - o Geen verbetering van pijnsymptomen optreden ondanks pijnstilling
 - o er een indicatie is voor sepsis
 - o een infectie optreedt ten gevolge van de canule en/of telemetrieoperatie die niet behandelbaar is.
 - o tekenen van inwendige bloeding in de post-operatieve periode
- Technische eindpunten: niet functioneren van de telemetriezender of verstopte canule.

2. in de testperiode:

Na herstel van de operatie worden er humane eindpunten gehanteerd. Deze worden gebaseerd op:

- Het optreden van bijwerkingen ten gevolge van de testsubstanties: Ten gevolge van het toedienen van de teststoffen kunnen er tijdelijke veranderingen optreden in cardiovasculaire parameters en tijdelijke veranderingen in gedrag. Indien deze niet van voorbijgaande aard zijn of niet corrigeerbaar wordt het dier uit experiment genomen. Humane eindpunten zijn gebaseerd op telemetrie data in combinatie met klinische symptomen gebaseerd op onder andere bewustzijn, activiteit, houding, gedrag, interactie met kooigenoten, lichaamsconditie, gang en gewicht. Bij gewichtsverlies van meer dan 15% of klinische symptomen die indicatief zijn voor matig ongerief wordt een dier uit experiment gehaald. Er wordt een welzijnsscoringslijst opgesteld en afgestemd met de IvD. Wanneer de toename in bloeddruk meer dan 50 mmHg is en wanneer de hartslagfrequentie meer dan 100 slagen/minuut toeneemt, worden er humane eindpunten gehanteerd.
- Technische eindpunten: niet functioneren van de telemetriezender of verstopte canule.

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

- Kans op complicaties na operatie: <5%
 - Kans op complicaties ten gevolge van cardiovasculaire bijwerkingen van de testsubstantie waardoor dier uit experiment genomen wordt: 10%
 - Kans op technische eindpunten (voornamelijk het dichtzitten van de infuuslijn): 5%
- Totaal 20%

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Bij de operatie om de telemetrie-zenders en de canule in de dieren te plaatsen hoort de classificatie "matig ongerief". De i.v. toediening van de teststoffen zal zorgen voor "mild ongerief" indien er geen bijwerkingen worden vastgesteld. Hergebruik van de dieren om een nieuwe teststof te evalueren is mogelijk indien de voorgaande teststoffen maximaal mild en geen-blijvend ongerief/bijwerkingen veroorzaakt hebben.

De dieren zullen in eerste instantie volgens de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest worden. Zodra geconstateerd wordt dat de dieren aan de canule zullen gaan knagen, dan wordt er overgestapt op individuele huisvesting. De kans dat dit nodig zal zijn wordt op basis van de Instantie van Dierenwelzijn 5.1 lid2h op heel klein geschat, omdat er in deze studie gebruikt wordt gemaakt van "vascular access port buttons". Deze buttons voorkomen dat de dieren bij elkaar aan de canules kunnen knagen. Deze buttons blijken in meerdere studies succesvol tegen het knagen aan de canule. Mocht er in een uitzonderlijk geval toch aan de canule geknaagd kunnen worden, dan worden de dieren individueel gehuisvest, wat kan zorgen voor mild ongerief.

Tijdens de pilot worden de volgende procedures uitgevoerd die bijdragen aan ongerief voor de dieren:

- Operatie om telemetrie-zenders en de canule in de dieren te plaatsen (matig ongerief)
- Doding van de dieren (mild ongerief)
- Eventueel: individuele huisvesting (mild ongerief)

Tijdens het hoofdexperiment worden de volgende procedures uitgevoerd die bijdragen aan ongerief voor de dieren:

- Operatie om telemetrie-zenders en de canule in de dieren te plaatsen (matig ongerief)
- I.V. toediening van de teststoffen (mild cumulatief ongerief; cumulatief door de repeterende toediening van teststoffen, max. 5 weken na elkaar).
- Doding van de dieren (mild ongerief)
- Eventueel: individuele huisvesting (mild ongerief)

Het totale ongerief zal voor 100% van de dieren matig zijn.

G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	<p>De <i>in vitro</i> screening met cellijnen die de adrenoreceptoren (α_1, α_2, β_1, β_2) en TAAR1 tot overexpressie brengen, zorgen voor vervanging van <i>ex vivo</i> dierproeven met een groot deel van de te onderzoeken teststoffen. Teststoffen die in deze <i>in vitro</i> screening geen effect vertonen worden niet onderzocht in de <i>ex/in vivo</i> dierstudies, omdat de verwachting is dat bij de afwezigheid van <i>in vitro</i> effecten er ook geen <i>ex vivo</i> effecten gemeten gaan worden. Ook stoffen met milde <i>in vitro</i> effecten ($EC_{50} > 10 \mu M$ en $E_{max} < 70\%$) worden niet verder bestudeerd in de dierstudies.</p> <p>Momenteel is het nog niet mogelijk om sympathomimetische effecten van deze stoffen in mensen te onderzoeken. Om een duidelijk beeld te krijgen van het verloop van eventuele effecten worden hartslagfrequentie, hartcontractiekracht en bloeddruk continu gemonitord (telemetrie). Continue meting van bloeddruk is in mensen alleen mogelijk door de inbreng van een arteriële canule¹³. Het inbrengen van een arteriële</p>
------------	--

	<p>canule is een te invasieve procedure voor humane studies. Daarom is nog niet mogelijk deze dierstudie te vervangen door een humane <i>in vivo</i> studie.</p>
Vermindering	<p>De <i>in vitro</i> receptoractivatie studies zorgen ook voor vermindering in het aantal benodigde dieren voor de <i>in vivo</i> en <i>ex vivo</i> dierproeven. Stoffen die <i>in vitro</i> geen effecten vertonen worden niet meegenomen in de <i>in/ex vivo</i> dierstudies, waardoor het aantal benodigde dieren afneemt. Door het gebruik van wash-outperiodes in de <i>in vivo</i> studie kunnen er meerdere stoffen in één dier worden bestudeerd, wat ook zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren.</p> <p>Daarnaast zullen er zoveel als mogelijk mesenteriale vaten uit één dier geïsoleerd worden, waardoor er meerdere teststoffen tegelijkertijd bestudeerd kunnen worden en er uiteindelijk minder dieren nodig zijn om effecten van alle stoffen te bestuderen.</p> <p>Ook geeft de powerberekening aan wat het minimaal aantal benodigde dieren is om effecten te kunnen waarnemen.</p>
Verfijning	<p>Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en succesvoller geïsoleerd kunnen. Doordat de isolaties sneller plaats kunnen vinden dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere vaten te isoleren uit het mesenterium van de rat. Dit zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren en ook voor verfijning van de dierproeven doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden.</p> <p>Daarnaast zijn de proeven verfijnd door meerdere organen/weefsels uit één dier te isoleren. De proeven met de mesenteriale vaten horen met vers geïsoleerde organen uitgevoerd te worden ^{7,9}.</p> <p>De ingebouwde telemetriezendes kunnen bloeddruk, hartslagfrequentie, hartcontractiekracht en lichaamstemperatuur continu meten. Dit zorgt ook voor verfijning van de proef, omdat er gemonitord kan worden of deze parameters bij de dieren op gezonde niveaus zijn (buiten de experimenten met toediening van mogelijk sympathomimetische stoffen om). Ook verfijnen de telemetriezendes de dierproef, doordat er geen extra handelingen met de dieren uitgevoerd hoeven te worden tijdens de blootstellingen aan de teststoffen. De dieren worden op die momenten met rust gelaten.</p> <p>Daarnaast worden zowel de dieren als de uitvoerders getraind voor het flushen van de canule, waardoor de proef ook verfijnd wordt. Hierdoor wordt de kans kleiner dat canules verstopt raken en dieren hier eventueel ongemak van ondervinden.</p> <p>Referenties De referenties zijn beschreven op de laatste bladzijde van dit document</p>
Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?	
<input checked="" type="checkbox"/> Nee	
<input type="checkbox"/> Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.	

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

I. Herhaling

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

[n.v.t.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

De dieren worden gedood om de organen te isoleren die nodig zijn voor de *ex vivo* studies voor de beantwoording van de hoofd- en subvragen.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

De dieren worden gedood middels decapitatie. De keuze gaat uit naar deze dodingsmethode, omdat deze methode minimale effecten heeft op het hersenweefsel dat gebruikt wordt voor de latere *ex vivo* studies. Er zal geen anestheticum in de hersenen achterblijven en er zal geen beschadiging optreden aan de hersenstam (in tegenstelling tot een overdosis anesthesie)^{10,11}. Daarnaast kunnen andere methoden, zoals een overdosis

anesthesie en CO₂ inhalatie, de vaatfunctie beïnvloeden, wat niet wenselijk is voor de latere *ex vivo* vaatstudies¹² In de literatuur staat, tot zover bekend, niet beschreven of decapitatie de vasculaire functie beïnvloedt. Echter, de voordelen van deze dodingsmethode voor de kwaliteit van het hersenweefsel zijn groter dan de eventuele nadelige (onbekende) effecten op de vaten. Daarnaast worden alle dieren op dezelfde manier gedood, inclusief de controles, waardoor correctie voor eventuele effecten is ingebouwd in de studie.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.
n.v.t.

Referenties

1. Milesi-Hallé, A., Hendrickson, H. P., Laurenzana, E. M., Gentry, W. B. & Owens, S. M. Sex- and dose-dependency in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of (+)-methamphetamine and its metabolite (+)-amphetamine in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **209**, 203–213 (2005).
2. Koeslag, D., St, A., Russell, J. C., Humphreys, A. S. & Russell A, J. C. *A technique for long-term venous cannulation in rats.* (1984).
3. de Jong, W. H., Timmerman, A. & van Raaij, M. T. M. Long-term cannulation of the vena cava of rats for blood sampling: local and systemic effects observed by histopathology after six weeks of cannulation.
4. Razenberg, L., Notenboom, S. & de Wit-Bos, L. Het gebruik van workout-supplementen door sporters in Nederland. *RIVM-rapport 0116*, (2021).
5. Evans, J. M. *et al.* Gender differences in autonomic cardiovascular regulation: spectral, hormonal, and hemodynamic indexes. *J Appl Physiol* **91**, 2611–2618 (2001).
6. Kapsokalyvas, D. *et al.* Imaging evidence for endothelin ETA/ETB receptor heterodimers in isolated rat mesenteric resistance arteries. *Life Sciences* **111**, 36–41 (2014).
7. Vrolijk, M. F. *et al.* The supplement–drug interaction of quercetin with tamsulosin on vasorelaxation. *European Journal of Pharmacology* **746**, 132–137 (2015).
8. Sanada, L. S., Tavares, M. R., Neubern, M. C. M., Salgado, H. C. & Fazan, V. P. S. Can Wistar rats be used as the normotensive controls for nerve morphometry investigations in spontaneously hypertensive rats (SHR)? *Acta Cirúrgica Brasileira* **26**, 514–520 (2011).
9. Watanabe, M. & Okada, T. Langendorff perfusion method as an *ex vivo* model to evaluate heart function in rats. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1816 107–116 (Humana Press Inc., 2018).
10. Cressey, D. Best way to kill lab animals sought. *Nature* **500**, 130–131 (2013).
11. Hawkins, P. *et al.* A Good Death? Report of the Second Newcastle Meeting on Laboratory Animal Euthanasia. *Animals 2016, Vol. 6, Page 50* **6**, 50 (2016).
12. Boivin, G. P., Hickman, D. L., Creamer-Hente, M. A., Pritchett-Corning, K. R. & Bratcher, N. A. Review of CO₂ as a Euthanasia Agent for Laboratory Rats and Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **56**, 491 (2017).
13. Saugel, B., Kouz, K., Meidert, A., Schulte-Uentrop, L., Romagnoli, S. How to measure blood pressure using an arterial catheter: A systematic 5-step approach. *Critical Care* **24**:172 (2020).
14. Cornelissen, V., Verheyden, B., Aubert, A. *et al.* Effects of aerobic training intensity on resting, exercise and post-exercise blood pressure, heart rate and heart-rate variability. *J Hum Hypertens* **24**, 175–182 (2010).
15. Maris, M. E., Melchert, R. B., Joseph, J. & Kennedy, R. H. Gender differences in blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **32**, 35–39 (2005).
16. Cosson, E. *et al.* Aortic stiffness and pulse pressure amplification in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **292**, 2506–2512 (2007).
17. Blagonravov, M. L. *et al.* 24-Hour Profile of Blood Pressure, Heart Rate, Excretion of Electrolytes, and Locomotor Activity in Wistar-Kyoto and SHR Rats Under Conditions of Free-Run Rhythm. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* (2018).

Naam van het project	Testen van veiligheid van stoffen in voedingssupplementen voor mensen bij ratten
NTS-identificatiecode	NTS-NL-978193 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	32
Trefwoorden	voedingssupplementen farmcologisch actieve stoffen veiligheid; risicobeoordeling onvrijwillig zenuwstelsel hart- en vaatstelsel
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Cardiovasculair, bloed- en lymfestelsel Fundamenteel onderzoek: Zenuwstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Niet op grond van regelgeving vereist toxicologisch en ecotoxicologisch onderzoek

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Op de Nederlandse markt zijn voedingssupplementen te koop die mensen nemen voor, tijdens of na het sporten. In deze supplementen zijn stoffen gevonden waarvan de veiligheid voor de mens niet onderzocht is. Deze stoffen lijken op stoffen die het onvrijwillige zenuwstelsel kunnen activeren. Activering van dit zenuwstelsel zorgt voor een toename in bloeddruk, hartslagsnelheid en sterkte van de hartslag. Het is echter niet bekend of de gevonden stoffen hiervoor kunnen zorgen. Ook is het niet bekend of deze stoffen giftig kunnen zijn voor de mens. Daarom is het doel van dit onderzoek om te onderzoeken of deze stoffen het onvrijwillige zenuwstelsel kunnen activeren en of deze stoffen giftig kunnen zijn voor de mens. Op deze manier kan er gekeken worden of deze supplementen veilig zijn en of ze eventueel verboden moeten worden.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	Het is van belang voor de maatschappij dat er onderzoek wordt gedaan naar de effecten op het onvrijwillige zenuwstelsel van deze stoffen in voedingssupplementen. Zo kunnen consumenten beter ingelicht worden over de veiligheid van deze supplementen. Als de stoffen inderdaad gevaarlijk blijken, geeft dit aanleiding om de stoffen te verbieden. Zo kan mogelijk ernstige gezondheidsschade (bijv. hartaanval, hersenbloeding, sterfte) voorkomen worden. Het is bekend dat een te grote activering van het onvrijwillige zenuwstelsel kan leiden tot ernstige gezondheidsschade zoals hartaanval, hersenbloeding en sterfte. Ook wordt de wetenschap met de uitkomsten van dit project vooruit geholpen. Dit project zorgt namelijk voor meer kennis over de werking van de te onderzoeken stoffen en stoffen die hierop lijken.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Ratten zullen 1 operatie (onder narcose) ondergaan (max. 2 uur) voor de plaatsing van draadloze zenders in de buik en voor plaatsing van een hol buisje in een bloedvat, waar later het infuus aan verbonden kan worden. Zij krijgen in totaal maximaal 5 keer op verschillende dagen een teststof via een infuus (max. 4 uur). Omdat de hersenen na doding van het dier nodig zijn om effecten van de teststoffen op de hersenen te onderzoeken, wordt het dier gedood door onthoofding. Na overlijden worden bloedvaten en hersenen uit het lichaam gehaald. Deze organen worden gebruikt om verder te onderzoeken buiten het lichaam.</p>					
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Na de operatie kunnen de dieren matige pijn en/of stress ervaren. Zij zullen minimaal twee weken nodig hebben om te herstellen. De teststoffen kunnen de bloeddruk, ademhaling en hartslag van de dieren veranderen. Dit zal van korte duur zijn (max. 4 uur).</p>					
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>			
			<p>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</p>
	<p>Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)</p>	<p>126</p>	<p>0</p>	<p>0</p>	<p>126</p>	<p>0</p>
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>				
		<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Geadopteerd</p>		
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Nadat de dieren zijn gedood, kunnen de effecten van actieve stoffen in voedingssupplementen op bloedvatvernauwing en -verwijding en hersencelfunctie bestudeerd worden buiten het lichaam van de dieren. Het gebruik van deze methodes buiten het lichaam van het dier zorgen ervoor dat de dieren geen nadelige bijwerkingen zullen ondervinden.</p>					

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Andere methoden om effecten op hartslag (snelheid en kracht) te bestuderen zijn studies met cellen in het lab (zonder dat er levende mensen of dieren aan te pas komen). Daarom testen we de stoffen eerst in cellen die betrokken zijn bij vaatvernauwing, vaatverwijding, hartslagsnelheid en –kracht. Stoffen die geen effecten laten zien op deze cellen, worden niet onderzocht in de dieren. Voor die stoffen hoeven dus geen ratten te worden gebruikt. Vervangen van de dierproef in zijn geheel is niet mogelijk, omdat het onvrijwillige zenuwstelsel uit meerdere organen bestaat en de invloed van de verschillende organen op elkaar niet is na te bootsen buiten het lichaam. Het onderzoek kan niet in mensen uitgevoerd worden, omdat voor de bloeddruk en hartslag (snelheid en kracht) continu gemeten moet worden. Hiervoor moet apparatuur in het bloedvat ingebracht worden, wat een ingrijpende procedure is voor mensen. Ook is het niet mogelijk dit onderzoek in ongewervelde diersoorten, uit te voeren omdat bloeddruk en hartslag in deze dieren moeilijker te meten is dan in zoogdieren. Daarnaast zijn de verschillen van de receptoren in het onvrijwillige zenuwstelsel tussen mens en ongewervelde diersoorten groter dan tussen mens en rat, waardoor de resultaten van de rat beter laten zien wat het effect van de stoffen op de mens zouden zijn.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Om zo min mogelijk dieren te gebruiken wordt het aantal dieren dat nodig is in dit project bepaald met behulp van een statistische berekening. Er zullen niet meer dieren worden gebruikt dan nodig zijn voor betrouwbare resultaten.

De eerdergenoemde test van de stoffen op cellen zonder dat er mensen of dieren aan te pas komen, zorgt ook voor vermindering in het aantal benodigde dieren voor de dierproeven. Stoffen die in de cellen geen effecten vertonen, worden niet getest op dieren, waardoor het aantal dieren dat nodig is afneemt. Er zullen meerdere teststoffen in 1 dier bestudeerd worden, om zo het aantal dieren dat nodig is te verminderen. Daarnaast zullen er zoveel als mogelijk bloedvaten uit één dier gehaald worden, waardoor er meerdere teststoffen tegelijkertijd bestudeerd kunnen worden en er uiteindelijk minder dieren nodig zijn om effecten van alle stoffen te bestuderen.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Het ongemak wordt zo minimaal mogelijk gemaakt door dieren voor de operatie pijnstilling te geven en ze veel tijd te geven om te herstellen. Ook na de operatie zullen zij pijnstilling krijgen. De ingebrachte meetapparatuur zorgt ook voor verfijning van de proef, omdat er continu gemonitord kan worden of de bloeddruk, hartslag (snelheid en kracht) en lichaamstemperatuur bij de dieren op gezonde niveaus zijn (buiten de tests met de stoffen om). Ook hoeven er zo geen extra handelingen met de dieren uitgevoerd te worden tijdens het onderzoek. De dieren worden op die momenten met rust gelaten.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Er is gekozen voor de rat als diersoort, om de haalbaarheid van de uitvoering van de proeven te waarborgen. De rat heeft grotere organen dan kleinere knaagdieren, zoals de muis. Dit zorgt ervoor dat de organen sneller en succesvoller uit het lichaam gehaald kunnen worden. Doordat dit sneller kan dan bij de kleinere knaagdieren, is er meer tijd om meerdere bloedvaten uit de rat te halen. Dit

zorgt voor een vermindering van het aantal benodigde dieren doordat er meerdere studies met één dier uitgevoerd kunnen worden.

Er is gekozen voor ratten, omdat zij een normale bloeddruk hebben en veelvuldig gebruikt worden als controlemodel voor onderzoek naar het hart- en vaatstelsel. De keuze gaat uit naar volwassen dieren om zo de gebruikersgroep van de voedingssupplementen gericht op sportprestaties in de samenleving na te bootsen.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: maandag 5 december 2022 11:26
Aan: 5.1 lid2e
CC: Braunstahl, drs. F. (Ferry)
Onderwerp: RE: Ondertekening AVD 5.1 lid2h 202216336

Goedemorgen,
 Zie hieronder mijn reactie en [de deels aangepaste beschikking](#)
 @ 5.1 lid2e ik heb beschikking 5 gebruikt was dit de laatste versie?

Groet! 5.1 lid2e

Van: Braunstahl, drs. F. (Ferry) 5.1 lid2e
Verzonden: vrijdag 2 december 2022 08:44
Aan: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: Ondertekening AVD 5.1 lid2h 202216336

Goedemorgen 5.1 lid2e en 5.1 lid2e

Ik bekeek de afwijzing gister einde van de middag en toen vielen me een paar zaken op:

- Er wordt een paar keer gesproken van 'geen groot belang'. 5.2 lid1 5.1 lid2e
- Er staat twee keer dat de CCD en de minderheid van de DEC iets vinden. 5.2 lid1
 mee eens aangepast zie aangepaste beschikking
- Ik snap de indeling niet helemaal, gelijk bij de start staat: "Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. 1) De NVWA heeft voedingssupplementen..." wat zijn de 1, 2 en 3 die volgen? Ik mis denk ik een bruggetje door een tussenzin of er hoort geen nummering in.
 mee eens, hier liepen we tegen de beperkingen van Maus aan.
 Ik zie het het liefst zonder nummering en ik heb dit stuk (Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC) verplaatst. Zie aangepaste beschikking.
- Ik vond het moeilijk om de laatste twee afwijsgonden (gedachtenstreepjes) goed uit elkaar te halen: lopen haalbaarheid en schade-baten analyse hier door elkaar?

-Volgens mij wordt in het tweede gedachtestreepje gemotiveerd waarom de CCD het belang niet groot genoeg vindt.
 -Bij het derde gedachtestreepje (schade-batenanalyse) moet worden afgewogen waarom de CCD van oordeel is dat de schade baten analyse negatief uitvalt.

De twijfel over de haalbaarheid van het doel van het project is inderdaad wel een groot onderdeel waarom de schade baten analyse negatief uitvalt. Misschien kan dit meer puntsgewijs onder elkaar worden gezet.

Schade= onnodig ongerief aan de proefdieren om voedingssupplementen te onderzoeken omdat de sporters op een andere wijze geïnformeerd kunnen worden over de supplementen
 Baten= er wordt meer te weten gekomen over de stoffen, de genoemde baten dan wel belang van het project door de aanvrager wordt door de CCD in twijfel getrokken.

kun je dit in je eigen woorden opschrijven 5.1 lid2e hierbij kun je de bewoordingen uit de beschikking aanhouden.

- 5.2 lid1
 Want dan ontbreekt deze afwijsggrond. Volgens mij gaf 5.1 lid2e aan dat de stoffen wel duidelijk in de aanvraag staan.

Ik ben kritisch op deze tekst **5.2 lid1**

En die tijd hebben we nog ruimschootst. Dus ik hoop dat jullie er nog even goed naar willen kijken samen! Als ik te kritisch ben, hoor ik t ook graag 😊

Kritisch zijn is prima hoor Ferry 😊

Groeten, Ferry

Van: **5.1 lid2e**

Verzonden: vrijdag 2 december 2022 08:04

Aan: Braunstahl, drs. F. (Ferry) **5.1 lid2e**

Onderwerp: RE: Ondertekening AVD **5.1 lid2h** 202216336

Goedemorgen Ferry,

Dat heb ik vergeten bij te zetten. Ja, deze is afgestemd met **5.1 lid2e**. Ze gaf wel aan dat ze niet volledig op taalfouten heeft gelet. Dus mocht je er nog een zien, dan hoor ik het graag.

Groet,
5.1 lid2e

Van: Braunstahl, drs. F. (Ferry) **5.1 lid2e**

Verzonden: donderdag 1 december 2022 17:50

Aan: **5.1 lid2e**

Onderwerp: RE: Ondertekening AVD **5.1 lid2h** 202216336

Ha **5.1 lid2e**

Die heb je snel op papier gekregen! Is de tekst ook afgestemd met de juristen?

Groeten, Ferry

Van: info@zbo-ccd.nl <info@zbo-ccd.nl>

Verzonden: donderdag 1 december 2022 11:45

Aan: Braunstahl, drs. F. (Ferry) **5.1 lid2e**

5.1 lid2e

CC: **5.1 lid2e**

Onderwerp: Ondertekening AVD **5.1 lid2h** 202216336

Aanvraag AVD **5.1 lid2h** 202216336 staat klaar ter ondertekening.
Het betreft een nieuwe aanvraag.

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: dinsdag 6 december 2022 12:13
Aan: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: Ondertekening AVD 5.1 lid2h 202216336

Ha 5.1 lid2e zie hieronder in mijn aanpassingen (alleen de tweede en derde alinea). Ik heb de zinnen net iets anders achterelkaar geplaatst waardoor het (voor mij) een logischer geheel vormt. Ben je het ermee eens?

- Uit artikel 10, eerste lid, onder c, van de wet blijkt dat het verboden is om een dierproef te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend. Ook blijkt uit artikel 10a2, eerste lid, onder b, van de wet dat de doeleinden van het project het gebruik van dieren moeten rechtvaardigen.

De CCD is van oordeel dat in het projectvoorstel niet duidelijk is geworden waarom de volgende doelstelling van de experimenten niet behaald kan worden zonder invasieve handelingen. Stimulatie van handhaving van de genoemde stoffen. De veiligheid van sportvoedingssupplementen hoeven niet van tevoren worden vastgesteld door producenten. Uw aanvraag betreft geen wettelijk verplicht onderzoek waarvoor proefdieren moeten worden ingezet om de veiligheid te bepalen. De CCD kent aan het belang van het doel 'stimulering van handhaving' een beperkte waarde toe omdat het niet gebruiken van supplementen door sporters ook bewerkstelligd kan worden door voorlichtingscampagnes. Om deze reden is de CCD niet overtuigd dat het gebruik van dieren wordt gerechtvaardigd voor de doeleinden en het belang van het project zoals voorgeschreven in artikel 10, eerste lid, onder c, van de wet en artikel 10a2, eerste lid, onder b, van de wet

- Uit artikel 10a2, tweede lid, onder d, van de wet volgt dat de CCD een schade-batenanalyse moet maken, hierbij wordt een analyse gemaakt van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. In uw aanvraag wilt u testen welke vasculaire effecten actieve stoffen in niet essentiële voedingssupplementen hebben die genomen worden door sporters. De CCD is onvoldoende overtuigd van de toegevoegde waarde van het onderzoek ten opzichte van het gebruik van proefdieren met matig ongerief. Het onderzoek zou het fundament worden voor de NVWA om onveilig bevonden stoffen van de markt te kunnen halen. Voor de stimulatie van handhaving van stoffen hoeven er naar het oordeel van de CCD geen proefdieren gebruikt te worden. Zoals eerder opgemerkt is de CCD van mening dat sporters op een andere wijze geïnformeerd kunnen worden over de voedingssupplementen. Ook is de CCD er niet van overtuigd dat het door u genoemde doel, het van de markt halen van eventueel gevaarlijke stoffen, door de resultaten van deze projectaanvraag behaald zal worden. De CCD komt tot de conclusie dat het matig ongerief dat de dieren doormaken het doel niet rechtvaardigt. De balans in de ethische afweging van de schade-batenanalyse valt voor dit onderzoek negatief uit waardoor een vergunning niet wordt afgegeven.

Groetjes 5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: dinsdag 6 december 2022 11:36
Aan: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: Ondertekening AVD 5.1 lid2h 202216336

Hallo 5.1 lid2e

Hierbij de afwijsgonden:

- Uit artikel 1d, eerste lid, van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt dat een dierproef slechts wordt verricht wanneer het beoogde resultaat niet kan worden bereikt door middel van een wetenschappelijk verantwoorde methode of onderzoeksstrategie waarbij geen levende dieren worden gebruikt. De CCD is van oordeel dat met publieke campagnes de doelgroep kan worden gewezen op de effecten van deze niet essentiële voedingssupplementen. Het onderzoek is daarom maatschappelijk vervangbaar. Om deze reden is de CCD niet

overtuigd dat het beoogde resultaat alleen kan worden bereikt door middel van een dierproef zoals voorgeschreven in artikel 1d, eerste lid, van de wet.

- Uit artikel 10, eerste lid, onder c, van de wet blijkt dat het verboden is om een dierproef te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend. Ook blijkt uit artikel 10a2, eerste lid, onder b, van de wet dat de doeleinden van het project het gebruik van dieren moeten rechtvaardigen. Uw onderzoek betreft geen wettelijk verplicht onderzoek waarbij de veiligheid van voedingssupplementen voor sporters hoeft te worden vast gesteld. Na beoordeling van de aanvraag kent de CCD aan het belang van dit doel van het project slechts een beperkte waarde toe. De CCD is van oordeel dat in het projectvoorstel niet duidelijk is geworden waarom de doelstellingen van de experimenten niet behaald kunnen worden zonder invasieve handelingen. De CCD kent aan het belang van het doel 'stimulering van handhaving' een beperkte waarde toe omdat het niet gebruiken van supplementen door sporters ook bewerkstelligd kan worden door voorlichtingscampagnes. De veiligheid van sportvoedingssupplementen hoeven niet van tevoren worden vastgesteld door producenten. Uw aanvraag betreft geen wettelijk verplicht onderzoek waarvoor proefdieren moeten worden ingezet om de veiligheid te bepalen. Om deze reden is de CCD niet overtuigd dat het gebruik van dieren wordt gerechtvaardigd voor de doeleinden en het belang van het project zoals voorgeschreven in artikel 10, eerste lid, onder c, van de wet en artikel 10a2, eerste lid, onder b, van de wet.

- Uit artikel 10a2, tweede lid, onder d, van de wet volgt dat de CCD een schade-batenanalyse moet maken, hierbij wordt een analyse gemaakt van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. In uw aanvraag wilt u testen welke vasculaire effecten actieve stoffen in niet essentiële voedingssupplementen hebben die genomen worden door sporters. De CCD is onvoldoende overtuigd van de toegevoegde waarde van het onderzoek ten opzichte van het gebruik van proefdieren met matig ongerief. Het onderzoek zou het fundament worden voor de NVWA om onveilig bevonden stoffen van de markt te kunnen halen. Voor de stimulatie van handhaving van stoffen hoeven er in de ogen van de CCD geen proefdieren gebruikt te worden. Zoals eerder opgemerkt kunnen in de ogen van de CCD sporters op een andere wijze geïnformeerd worden over de voedingssupplementen. Daarom is de CCD van oordeel dat matig ongerief dat de dieren doormaken het doel niet rechtvaardigt. De CCD is er niet van overtuigd dat het door u genoemde doel, het van de markt halen van eventueel gevaarlijke stoffen, door deze projectaanvraag behaald zou worden. De balans in de ethische afweging (belang versus het ongerief van de proefdieren) van de schade-batenanalyse valt voor dit onderzoek negatief uit. Om deze redenen is voor de CCD de schade-batenanalyse, zoals bedoeld in artikel 10a2, tweede lid, onder d, van de wet negatief.

Conclusie: de schade-batenanalyse is negatief waardoor een vergunning niet wordt afgeven.
Deze kan weg want die heb ik in de alinea hierboven al verwerkt

Groet,
5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: maandag 5 december 2022 11:26
Aan: 5.1 lid2e
CC: Braunstahl, drs. F. (Ferry) 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: Ondertekening AVD 5.1 lid2h 202216336

Goedemorgen,
Zie hieronder mijn reactie en [de deels aangepaste beschikking](#)
@ 5.1 lid2e ik heb beschikking 5 gebruikt was dit de laatste versie?

Groet! 5.1 lid2e

Van: Braunstahl, drs. F. (Ferry) 5.1 lid2e
Verzonden: vrijdag 2 december 2022 08:44
Aan: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: Ondertekening AVD 5.1 lid2h 202216336

Goedemorgen 5.1 lid2e ,

Ik bekeek de afwijzing gister einde van de middag en toen vielen me een paar zaken op:

- Er wordt een paar keer gesproken van 'geen groot belang'. **5.2 lid1**
@**5.1 lid2e** kun je dit checken?
- Er staat twee keer dat de CCD en de minderheid van de DEC iets vinden. **5.2 lid1**

mee eens aangepast zie aangepaste beschikking

- Ik snap de indeling niet helemaal, gelijk bij de start staat: "Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. 1) De NVWA heeft voedingssupplementen..." wat zijn de 1, 2 en 3 die volgen? Ik mis denk ik een bruggetje door een tussenzin of er hoort geen nummering in.

mee eens, hier liepen we tegen de beperkingen van Maus aan.

Ik zie het het liefst zonder nummering en ik heb dit stuk (Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC) verplaatst. Zie aangepaste beschikking.

- Ik vond het moeilijk om de laatste twee afwijsgonden (gedachtenstreepjes) goed uit elkaar te halen: lopen haalbaarheid en schade-baten analyse hier door elkaar?

-Volgens mij wordt in het tweede gedachtestreepje gemotiveerd waarom de CCD het belang niet groot genoeg vindt.
-Bij het derde gedachtestreepje (schade-batenanalyse) moet worden afgewogen waarom de CCD van oordeel is dat de schade baten analyse negatief uitvalt.

De twijfel over de haalbaarheid van het doel van het project is inderdaad wel een groot onderdeel waarom de schade baten analyse negatief uitvalt. Misschien kan dit meer puntsgewijs onder elkaar worden gezet.

Schade= onnodig ongerief aan de proefdieren om voedingssupplementen te onderzoeken omdat de sporters op een andere wijze geïnformeerd kunnen worden over de supplementen

Baten= er wordt meer te weten gekomen over de stoffen, de genoemde baten dan wel belang van het project door de aanvrager wordt door de CCD in twijfel getrokken.

kun je dit in je eigen woorden opschrijven **5.1 lid2e** hierbij kun je de bewoordingen uit de beschikking aanhouden.

- **5.2 lid1**
Klopt dat? Want dan ontbreekt deze afwijsggrond. Volgens mij gaf **5.1 lid2e** aan dat de stoffen wel duidelijk in de aanvraag staan.

Ik ben kritisch op deze tekst **5.2 lid1**

En die tijd hebben we nog ruimschoots. Dus ik hoop dat jullie er nog even goed naar willen kijken samen! Als ik te kritisch ben, hoor ik t ook graag 😊

Kritisch zijn is prima hoor Ferry 😊

Groeten, Ferry

Van: **5.1 lid2e**

Verzonden: vrijdag 2 december 2022 08:04

Aan: Braunstahl, drs. F. (Ferry) **5.1 lid2e**

Onderwerp: RE: Ondertekening AVD **5.1 lid2h** 202216336

Goedemorgen Ferry,

Dat heb ik vergeten bij te zetten. Ja, deze is afgestemd met **5.1 lid2e** Ze gaf wel aan dat ze niet volledig op taalfouten heeft gelet. Dus mocht je er nog een zien, dan hoor ik het graag.

Groet,
5.1 lid2e

Van: Braunstahl, drs. F. (Ferry) **5.1 lid2e**

Verzonden: donderdag 1 december 2022 17:50

Aan: 5.1 lid2e

Onderwerp: RE: Ondertekening AVD 5.1 lid2h 202216336

Ha 5.1 lid2e

Die heb je snel op papier gekregen! Is de tekst ook afgestemd met de juristen?

Groeten, Ferry

Van: info@zbo-ccd.nl <info@zbo-ccd.nl>

Verzonden: donderdag 1 december 2022 11:45

Aan: Braunstahl, drs. F. (Ferry) 5.1 lid2e ; 5.1 lid2e

5.1 lid2e

CC: 5.1 lid2e

Onderwerp: Ondertekening AVD 5.1 lid2h 202216336

Aanvraag AVD 5.1 lid2h 202216336 staat klaar ter ondertekening.

Het betreft een nieuwe aanvraag.

5.1 lid2e



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



Centrale Commissie

Dierproeven

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 789 0789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD 5.1 lid2h 202216336

Bijlagen

2

Datum 7 december 2022

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 17 augustus 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216336. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw aanvraag af. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna de wet niet is toegestaan het project "Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen" te starten.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij 5.1 lid2h (hierna: DEC. Dit advies is ontvangen op 2 november 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 18 november 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het ongerief, de huisvesting en de Niet-technische Samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

7 december 2022

Aanvraagnummer:

AVD **S.1 lid2h** 202216336

Overwegingen

De NVWA heeft voedingssupplementen, die gericht zijn om sportprestaties te bevorderen, onderzocht, waarbij één of meerdere farmacologische actieve stoffen zijn gevonden. De aanwezigheid van deze stoffen was niet altijd vermeld op de verpakking. Ook waren de concentraties van deze stoffen niet altijd te achterhalen of weken de gemeten concentraties af van de productspecificatie. Aangezien van veel gedetecteerde stoffen geen farmacologische gegevens beschikbaar zijn, kan dit mogelijk gezondheidsrisico's met zich meebrengen. Naar aanleiding hiervan wilt u een proefdieronderzoek uitvoeren om de effecten van "trace-amine"- en catecholamine-achtige stoffen in voedingssupplementen gericht op sportprestatiebevordering op het sympathisch zenuwstelsel te bestuderen om zo bij te dragen aan de risicobeoordeling en stimulatie van handhaving van deze stoffen. Dit onderzoek wilt u uitvoeren in ratten, welke matig ongerief zullen ondergaan.

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Het uitgebrachte DEC-advies is niet unaniem tot stand gekomen. De meerderheid van de DEC heeft een positief advies afgegeven. Eén DEC-lid heeft een minderheidsstandpunt geformuleerd. Citaat: "Sporters zijn een belangrijke uiteindelijke stakeholder in dit project dat gericht is op het bepalen van de veiligheid van sportvoedingssupplementen.

Sportvoedingssupplementen die op de markt zijn kunnen onveilig zijn, omdat de veiligheid ervan niet van tevoren vastgesteld hoeft te worden door producenten. In dit onderzoek worden ratten ingezet om deze veiligheid te bepalen. Bescherming van sporters kan echter ook gepromoot worden door weet-wat-je-eet-achtige publieke campagnes in plaats van het inzetten van proefdieren. Sporters hebben uiteindelijk een eigen verantwoordelijkheid. In die zin is dit onderzoek maatschappelijk vervangbaar. Op basis hiervan, en gekoppeld aan het matige ongerief voor de dieren, kwam dit DEC-lid tot een negatief advies."

De CCD volgt dit minderheidsstandpunt. De CCD wijkt af van het DEC-advies om de volgende redenen:

- Uit artikel 10, eerste lid, onder c, van de wet blijkt dat het verboden is om een dierproef te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend. Ook blijkt uit artikel 10a2, eerste lid, onder b, van de wet dat de doeleinden van het project het gebruik van dieren moeten rechtvaardigen.

Datum:
7 december 2022
Aanvraagnummer:
AVD **5.1 lid2h** 202216336

- De CCD is van oordeel dat in het projectvoorstel niet duidelijk is geworden waarom de doelstelling van de experimenten niet behaald kan worden zonder invasieve handelingen (Stimulatie van handhaving van de genoemde stoffen). De veiligheid van sportvoedingssupplementen hoeven niet van tevoren worden vastgesteld door producenten. Uw aanvraag betreft geen wettelijk verplicht onderzoek waarvoor proefdieren moeten worden ingezet om de veiligheid te bepalen. De CCD kent aan het belang van het doel 'stimulering van handhaving' een beperkte waarde toe omdat het niet gebruiken van supplementen door sporters ook bewerkstelligd kan worden door bijvoorbeeld voorlichtingscampagnes. Om deze reden is de CCD niet overtuigd dat het gebruik van dieren wordt gerechtvaardigd voor de doeleinden en het belang van het project zoals voorgeschreven in artikel 10, eerste lid, onder c, van de wet en artikel 10a2, eerste lid, onder b, van de wet.

- Uit artikel 10a2, tweede lid, onder d, van de wet volgt dat de CCD een schade-batenanalyse moet maken, hierbij wordt een analyse gemaakt van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. In uw aanvraag wilt u testen welke vasculaire effecten actieve stoffen in niet essentiële voedingssupplementen hebben die genomen worden door sporters. De CCD is onvoldoende overtuigd van de toegevoegde waarde van het onderzoek ten opzichte van het gebruik van proefdieren met matig ongerief. Het onderzoek zou het fundament worden voor de NVWA om onveilig bevonden stoffen van de markt te kunnen halen. Voor de stimulatie van handhaving van stoffen hoeven er naar het oordeel van de CCD geen proefdieren gebruikt te worden. Zoals eerder opgemerkt is de CCD van mening dat sporters op een andere wijze geïnformeerd kunnen worden over de voedingssupplementen. Ook is de CCD er niet van overtuigd dat het door u genoemde doel, het van de markt halen van eventueel gevaarlijke stoffen, door de resultaten van deze projectaanvraag behaald zal worden. De CCD komt tot de conclusie dat het matig ongerief dat de dieren doormaken het doel niet rechtvaardigt. De balans in de ethische afweging van de schade-batenanalyse valt voor dit onderzoek negatief uit waardoor een vergunning niet wordt afgegeven.

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.

Datum:

7 december 2022

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid2h** 202216336

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.

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: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid2h

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Aanvraagnummer: AVD^{5.1 lid2h}202216336

Weergave wet- en regelgeving

Artikel 1d, eerste lid, van de wet,

Een dierproef wordt slechts verricht wanneer het beoogde resultaat niet kan worden bereikt door middel van een wetenschappelijk verantwoorde methode of onderzoeksstrategie waarbij geen levende dieren worden gebruikt.

Artikel 10, eerste lid, onder c van de wet,

Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.

Artikel 10a2, eerste lid, onder b, van de wet,

De centrale commissie dierproeven verleent slechts een projectvergunning voor een project indien: de doeleinden van het project het gebruik van dieren rechtvaardigen;

Artikel 10a2, tweede lid, onder d, van de wet,

De projectbeoordeling omvat in het bijzonder: een analyse van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu;

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: maandag 12 december 2022 09:05
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216336

Geachte 5.1 lid2h,

Op 17-08-2022 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Sympathomimetische effecten van farmacologisch actieve stoffen in voedingssupplementen' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216336.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op het ongerief, de huisvesting en de Niet-technische Samenvatting.

De CCD heeft besloten de vergunning af te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 7-12-2022.

Hieronder is de reden van afwijzen weergegeven:

- Uit artikel 10, eerste lid, onder c, van de wet blijkt dat het verboden is om een dierproef te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend. Ook blijkt uit artikel 10a2, eerste lid, onder b, van de wet dat de doeleinden van het project het gebruik van dieren moeten rechtvaardigen.
- De CCD is van oordeel dat in het projectvoorstel niet duidelijk is geworden waarom de volgende doelstelling van de experimenten niet behaald kan worden zonder invasieve handelingen. Stimulatie van handhaving van de genoemde stoffen. De veiligheid van sportvoedingssupplementen hoeven niet van tevoren worden vastgesteld door producenten. Uw aanvraag betreft geen wettelijk verplicht onderzoek waarvoor proefdieren moeten worden ingezet om de veiligheid te bepalen. De CCD kent aan het belang van het doel 'stimulering van handhaving' een beperkte waarde toe omdat het niet gebruiken van supplementen door sporters ook bewerkstelligd kan worden door voorlichtingscampagnes. Om deze reden is de CCD niet overtuigd dat het gebruik van dieren wordt gerechtvaardigd voor de doeleinden en het belang van het project zoals voorgeschreven in artikel 10, eerste lid, onder c, van de wet en artikel 10a2, eerste lid, onder b, van de wet.
- Uit artikel 10a2, tweede lid, onder d, van de wet volgt dat de CCD een schade-batenanalyse moet maken, hierbij wordt een analyse gemaakt van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. In uw aanvraag wilt u testen welke vasculaire effecten actieve stoffen in niet essentiële voedingssupplementen hebben die genomen worden door sporters. De CCD is onvoldoende overtuigd van de toegevoegde waarde van het onderzoek ten opzichte van het gebruik van proefdieren met matig ongerief. Het onderzoek zou het fundament worden voor de NVWA om onveilig bevonden stoffen van de markt te kunnen halen. Voor de stimulatie van handhaving van stoffen hoeven er naar het oordeel van de CCD geen proefdieren gebruikt te worden. Zoals eerder opgemerkt is de CCD van mening dat sporters op een andere wijze geïnformeerd kunnen worden over de voedingssupplementen. Ook is de CCD er niet van overtuigd dat het door u genoemde doel, het van de markt halen van eventueel gevaarlijke stoffen, door de resultaten van deze projectaanvraag behaald zal worden. De CCD komt tot de conclusie dat het matig ongerief dat de dieren doormaken het doel niet rechtvaardigt. De balans in de ethische afweging van de schade-batenanalyse valt voor dit onderzoek negatief uit waardoor een vergunning niet wordt afgegeven.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de

aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. U geeft duidelijk weer welke knelpunten u bent tegengekomen tijdens de behandeling van deze aanvraag.

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl