

Inventaris Wob-verzoek W16-07S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015236								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5			x					
9	Bijlage beschrijving dierproeven 6			x					
10	DEC-advies				x		x	x	
11	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
12	Mail vraag en antwoord 5-10-2015				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Mail beschikking 14-10-2015				x		x	x	



AVD 104002015236

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10400
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Wageningen University
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	9215846
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59
		Postcode en plaats	6700 AB Wageningen
		IBAN	NL10 RABO 0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 1 - 12 - 2015 |
| Einddatum | 30 - 11 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|---|
| De rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme. |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|---|
| De rol van bepaalde genen in het energiemetabolisme |
|---|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|----------------------------------|
| Naam DEC | DEC-WU |
| Postadres | Postbus 9191, 6700 HB Wageningen |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

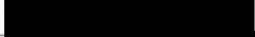
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde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

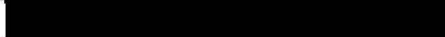
5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel + 6 bijlagen
- Niet-technische samenvatting
- DEC-advies
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging + mandaat besluit
- Bestelorder WUR 888369

6 Ondertekening

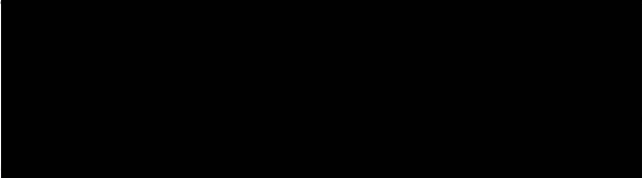
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

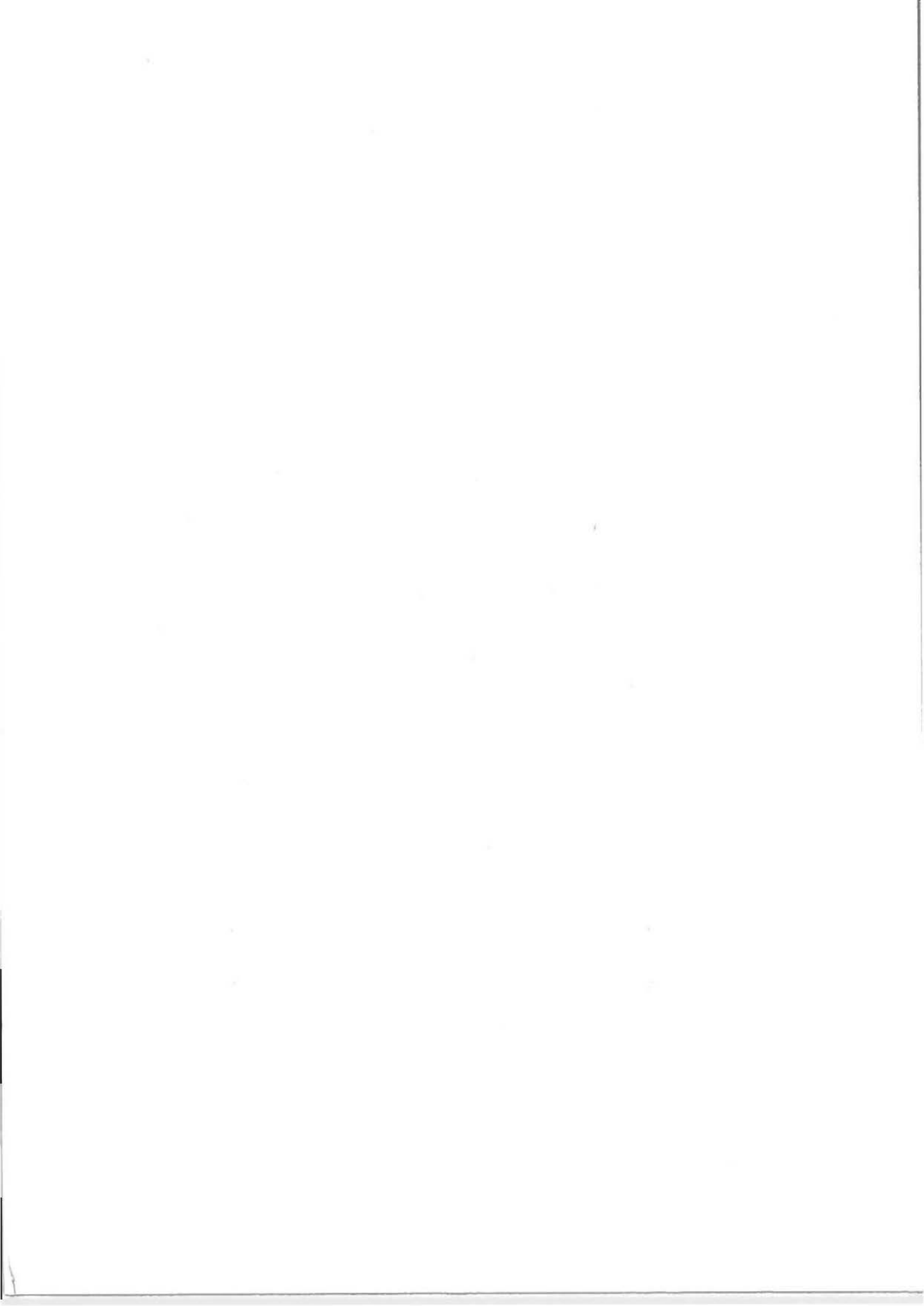
Naam 

Functie 

Plaats Wageningen

Datum 7 - 9 - 2015

Handtekening 





Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Welvaartsziekten zoals obesitas, diabetes, niet-alcoholische vette lever ziekte (NAFLD, omvat een spectrum aan leverziekten, namelijk van steatose tot niet-alcoholische steatohepatitis, fibrose en cirrose), en hart- en vaatziekten zijn verantwoordelijk voor een groot aantal ziekte- en sterftegevallen. Dit aantal kan middels betere preventie en geneeskundige behandeling aanzienlijk naar beneden worden gebracht. Obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten hebben hun primaire oorsprong in verstoringen van het energiemetabolisme. Daarnaast spelen veranderingen in het immuunsysteem een belangrijke rol bij de ontwikkeling van deze ziekten. De laatste decennia is aangetoond dat het immuunsysteem en het energiemetabolisme nauw met elkaar verweven zijn. Zo hebben diverse hormonen een rol in zowel het immuunsysteem als het energiemetabolisme. Een ander voorbeeld van de koppeling tussen het energiemetabolisme en het immuunsysteem is de overmatige opname van cholesterol door immuuncellen in de vaatwand tijdens de ontwikkeling van hart- en vaatziekten. Zowel het energiemetabolisme als het immuunsysteem bieden aldus aangrijpingspunten voor de verbeterde preventie en behandeling van obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten.

Veranderingen in levensstijl zoals verhoogde fysieke activiteit en aanpassing van de voeding vormen de basis voor de *preventie* van bovengenoemde stoornissen. Door deze veranderingen in levensstijl wordt het energiemetabolisme verbeterd. Een gezonde levensstijl is echter geen garantie dat mensen geen last krijgen van obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten. Voor de *behandeling* van diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten zijn veranderingen in levensstijl vaak onvoldoende effectief en/of nog lastig te implementeren, waardoor therapeutische benaderingen zoals gebruik van medicijnen onvermijdelijk zijn en nog vaak de voorkeur krijgen.

Om nieuwe therapieën voor deze welvaartsziekten te kunnen ontwikkelen is het belangrijk om te begrijpen hoe onze stofwisseling precies functioneert en wordt gereguleerd, en te analyseren wat er precies misgaat bij obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten.

Het hier beschreven project richt zich op de rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme. Tevens willen we de rol van deze genen en signaalroutes bij de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten ophelderen.

Binnen het project ligt de nadruk op de volgende genen en/of signaalroutes:

- a) Genen die betrokken zijn bij de verwerking van vet in de cel. De ophoping van vet in diverse cellen speelt een cruciale rol bij de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten. Het gaat hierbij om genen die gereguleerd worden door de zogenaamde PPAR factoren.
- b) Signaalroutes die betrokken zijn bij de interactie tussen immuuncellen en vetcellen. Tijdens de ontwikkeling van obesitas dringen diverse immuuncellen, waaronder macrofagen, het vetweefsel binnen. Deze immuuncellen veroorzaken een chronische ontsteking die mogelijk bijdraagt aan de ontwikkeling van diabetes en hart- en vaatziekten.
- c) Signaalroutes die worden geactiveerd door verandering van de samenstelling van de microbiota (bacteriën) in de darm. Er is een toenemend aantal aanwijzingen dat de bacteriën in ons darmkanaal een rol spelen in de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten. De samenstelling van de darmbacteriën kan worden

veranderd door aan het voer specifieke voedingsvezels toe te voegen. Daarnaast kan met behulp van antibiotica de darmbacteriën worden onderdrukt om zo te onderzoeken of darmbacteriën bijdragen aan de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het algemene doel van de proef is om beter inzicht te krijgen in de regulatie van het energiemetabolisme en het immuunsysteem tijdens gezondheid en (metabole) ziekten. Het project richt zich daarbij op de onderliggende mechanismen. De specifieke doelstelling van het project is om de fysiologische functie van specifieke genen en/of signaalroutes in het energiemetabolisme en het immuunsysteem op te helderen, en een mogelijke rol van deze genen en signaalroutes bij de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD, en hart en vaatziekten bloot te leggen. Uiteindelijk willen we de regulatie van het energiemetabolisme en het immuunsysteem beter in kaart brengen en nieuwe mogelijke aangrijpingspunten vinden voor de behandeling van metabole stoornissen zoals diabetes, NAFLD, en hart en vaatziekten, op grond van diepgaande kennis van de moleculaire processen die bij bovengenoemde ziekten verstoord zijn.

Vrijwel alle experimentele technieken en handelingen die in de verschillende onderdelen van dit project zijn beschreven zijn al eerder uitgevoerd binnen de onderzoeksgroep. Er is inmiddels veel ervaring met deze (be)handelingen.

3.3 Belang

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

De behandeling van hart- en vaatziekten is de laatste decennia flink verbeterd. Desondanks zijn hart- en vaatziekten, samen met kanker, nog steeds doodsoorzaak nummer 1 in vele Westerse landen. Het aantal patiënten met diabetes en NAFLD zal naar verwachting sterk toenemen, vooral als gevolg van het groeiend aantal mensen dat worstelt met (ernstig) overgewicht. Zowel diabetes en NAFLD zijn chronische ziekten die kunnen leiden tot een aantal ernstige co-morbiditeiten, waaronder neuropathie en blindheid, steatohepatitis, en leverfibrose. Daarnaast zijn diabetes en NAFLD hele belangrijke risicofactoren voor hart- en vaatziekten. Diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten worden primair veroorzaakt door verstoringen van het energiemetabolisme. Veranderingen in levensstijl zoals verhoogde fysieke activiteit en aanpassing van de voeding vormen de basis voor de *preventie* van bovengenoemde ziekten. Door deze veranderingen in levensstijl wordt het energiemetabolisme verbeterd. Voor de *behandeling* van diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten zijn veranderingen in levensstijl vaak onvoldoende effectief en/of nog lastig te implementeren, waardoor therapeutische benaderingen zoals gebruik van medicijnen onvermijdelijk zijn en nog vaak de voorkeur krijgen. Om verdere stappen te kunnen maken in de behandeling van diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten, zowel qua preventie via veranderingen in levensstijl alsmede via behandeling met medicijnen, is het belangrijk dat er meer inzicht wordt verkregen in hoe ons metabolisme werkt en wordt gereguleerd en tevens welke specifieke metabole signaalroutes ontspreken bij bovengenoemde ziekten. Ons project heeft daarbij niet zozeer een translationeel karakter en hanteert de muis niet als diermodel om concrete behandelingen te testen maar richt zich veeleer op de onderliggende mechanismen. De vraagstellingen zijn dus primair fundamenteel van aard met relevantie voor de metabole ziekten obesitas, diabetes,

NAFLD en hart- en vaatziekten.

Op basis van meerdere strategieën hebben wij een aantal genen en signaalroutes geïdentificeerd met een mogelijke rol in de ontwikkeling van bovengenoemde welvaartsziekten. Op dit moment is er echter nog relatief weinig bekend over de rol van de hier te bestuderen genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en het immuunsysteem, alsmede in de interactie tussen het energiemetabolisme en het immuunsysteem. We hebben echter goede aanwijzingen vanuit de literatuur en voorwerk binnen onze onderzoeksgroep die de aandacht op deze genen en signaalroutes rechtvaardigt.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De algemene strategie van het project is om de rol van specifieke genen en/of signaalroutes in het energiemetabolisme en het immuunsysteem bloot te leggen door gebruik te maken van specifieke muizenmodellen waarbij het gen of de signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd. Om genen of signaalroutes te activeren zal gebruik worden gemaakt van transgene muizen of muizen die behandeld worden met een adeno(-associated) virus. Om genen of signaalroutes te inactiveren zal gebruik worden gemaakt van knock-out muizen of muizen die behandeld worden met een adeno(-associated) virus.

Veel genen en signaalroutes worden vooral relevant wanneer een organisme wordt blootgesteld aan omstandigheden waarbij het metabolisme op de proef wordt gesteld. Voorbeelden zijn fysieke inspanning, koude, ondervoeding en overvoeding. Maar ook een infectie of behandeling met medicijnen kan het metabolisme extra belasten. Om de rol van specifieke genen of signaalroutes op te helderen zullen muizen waarin deze specifieke genen of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd worden onderworpen aan één van een vijftal mogelijke belastingen. Dit vijftal mogelijke belastingen vertegenwoordigen de eerste vijf typen dierexperimenten die in dit voorstel beschreven staan. Het zesde type dierexperiment omvat het vervaardigen van specifieke muizenmodellen waarbij een gen of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd.

Voor de proeven zal om praktische redenen gebruik worden gemaakt van mannelijke muizen. Het beoogde onderzoek en de fundamentele vraagstellingen die daarin gesteld worden spelen zich af op een niveau waarbij het geslacht naar verwachting een minimale of geen invloed heeft op de onderzoeksresultaten. We verwachten om die reden dat de resultaten van de dierproeven gelijkwaardig vertaalbaar zijn naar vrouwen en mannen.

Binnen het project willen we de rol van de volgende genen en/of signaalroutes onderzoeken:

- a) Genen die betrokken zijn bij de verwerking van vet in de cel. De ophoping van vet in diverse cellen speelt een cruciale rol bij de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten. Het gaat hierbij om genen die gereguleerd worden door de zogenaamde PPAR factoren.
- b) Signaalroutes die betrokken zijn bij de interactie tussen immuuncellen en vetcellen. Tijdens de ontwikkeling van obesitas dringen diverse immuuncellen waaronder macrofagen het vetweefsel binnen. Deze immuuncellen veroorzaken een chronische ontsteking die mogelijk bijdraagt aan de ontwikkeling van diabetes en hart- en vaatziekten.
- c) Signaalroutes die worden geactiveerd door verandering van de samenstelling van de

microbiota (bacteriën) in de darm. Er zijn toenemende aanwijzingen dat de bacteriën in ons darmstelsel een rol spelen in de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten. De samenstelling van de darmbacteriën kan worden veranderd door aan het voer specifieke voedingsvezels toe te voegen. Daarnaast kan met behulp van antibiotica de darmbacteriën worden onderdrukt om zo te onderzoeken of darmbacteriën bijdragen aan de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten.

In totaal zullen maximaal 25 genen en/of signaalroutes onderzocht worden.

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

Deze projectaanvraag bestaat uit verschillende onderdelen. Elk onderdeel beschrijft een bepaald type dierexperiment waarbij muizen aan een bepaalde belasting wordt onderworpen om het energiemetabolisme op de proef te stellen. Deze verschillende typen belastingen ("stressors") zullen worden uitgevoerd met muizen waarin specifieke genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd. Afhankelijk van de vermoede functie van het gen en/of signaalroute zal voor één van de vijf typen experimenten gekozen worden (zie 3.4.3).

Een separaat onderdeel bestaat uit het vervaardigen van muizen waarin een bepaald gen of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd (volgnummer 1).

- 2) Hoogvetdieet. Dit experimentele model omvat het geven aan muizen van een voer dat verrijkt is met vet (45-60 energieprocent), waarbij eventueel nog andere componenten in de voeding zoals vezel, mineralen, of een bepaalde metaboliet worden gemoduleerd. Dit experimenteel model leidt tot de ontwikkeling van overgewicht, NAFLD en insuline-ongevoeligheid bij muizen. Hierbij speelt het immuunsysteem een belangrijke rol. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd een voer te geven dat verrijkt is met vet kan de rol van dit gen of signaalroute bij het energiemetabolisme en bij bovengenoemde ziekten zichtbaar gemaakt worden.
- 3) Vasten. Dit experimentele model omvat het onthouden van muizen van voer gedurende maximaal 24 uur. Vasten leidt tot grote veranderingen in de energiestofwisseling in lever en vetweefsel. Zo wordt tijdens vasten de vetafbraak in het vetweefsel geactiveerd en de glucoseproductie in de lever gestimuleerd. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaal route is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan vasten kan de rol van dit gen of signaalroute bij de energiehuishouding beter zichtbaar gemaakt worden.
- 4) Koudeblootstelling. Dit experimentele model omvat het blootstellen van muizen aan een lage omgevingstemperatuur (5-7 graden Celsius) gedurende maximaal 10 dagen. Koudeblootstelling leidt tot grote veranderingen in de energiestofwisseling in diverse organen waaronder het vetweefsel. Volgens nieuwe inzichten zou het immuunsysteem hier een belangrijke rol bij spelen. Zo wordt tijdens koude de vetafbraak in het witte vetweefsel geactiveerd en tevens de vetopname in het bruine vetweefsel gestimuleerd. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan koude kan de rol van dit gen of signaalroute bij het energiemetabolisme beter zichtbaar gemaakt worden.
- 5) Immunactivatie. Dit experimentele model omvat het toedienen van stoffen aan muizen (zoals lipopolysaccharide) die het immuunsysteem activeren. Activatie van het

immuunsysteem leidt tot grote veranderingen in de energiestofwisseling in diverse weefsels. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan immunactivatie kan de rol van dit gen of signaalroute bij het immuunsysteem en het energiemetabolisme beter zichtbaar gemaakt worden.

- 6) Fysieke inspanning. Dit experimentele model omvat het blootstellen van muizen aan fysieke inspanning op een loopband. Fysieke inspanning leidt tot grote veranderingen in de energiestofwisseling in vooral spier, hart en lever. Tevens ontstaat er een ontstekingsreactie in de spier en mogelijk ook elders. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaal route is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan fysieke inspanning kan de rol van dit gen of signaalroute bij het energiemetabolisme beter zichtbaar gemaakt worden.

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

De onderdelen betreffen verschillende manieren om in verschillende organen en celtypen het energiemetabolisme extra te belasten, waarbij de rol van bepaalde genen of signaalroutes wordt onderzocht. Zo zorgt het geven van een voer dat verrijkt is met vet voor extra belasting van het vetmetabolisme in darm, lever, en vetweefsel, met beperkte effecten op het spierweefsel. Daarentegen zorgt fysieke inspanning voor extra belasting op het energiemetabolisme in spieren. Koudeblootstelling op haar beurt stelt hoge eisen aan het energiemetabolisme in het bruine en witte vetweefsel. Bij alle bovengenoemde belastingen speelt het immuunsysteem tevens een belangrijke rol. Bovenstaande informatie is gebaseerd op diverse eigen experimenten uit het recente verleden, alsmede een veelheid aan data in de literatuur (PMID 22101429, 22700822, 21547079, 21109191, 20858684, 14715917, 24591600). Afhankelijk van de vermoede functie van het gen en/of signaalroutes zullen één of meerdere van de vijf typen experimenten uitgevoerd worden. Aspecten die daarbij worden meegewogen zijn: a) in welke weefsels komt het gen tot expressie en/of is de signaalroute actief; b) wat is de respons van het gen of de signaalroute op koude, vasten, hoogvetvoer, fysieke inspanning; c) in welke mate en in welke weefsels wordt de expressie van het gen of de activiteit van de signaalroute beïnvloed door obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten; d) wat is de functie van qua structuur sterk vergelijkbare genen; e) welke overige relevante informatie mbt. de functie van het gen of de signaalroute is beschikbaar vanuit de literatuur.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	<i>Genereren en fokken van muizen waarin specifieke genen aan- of uitgeschakeld zijn</i>
2	<i>Hoogvetdieet</i>
3	<i>Vasten</i>
4	<i>Koude</i>
5	<i>Immuunactivatie</i>
6	<i>Fysieke inspanning</i>

7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.					
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Wageningen University				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Vervaardiging van muizen waarin een bepaald gen of signaalroute geactiveerd of geïnactiveerd is met behulp van adeno-associated virus</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Vervaardiging van muizen waarin een bepaald gen of signaalroute geactiveerd of geïnactiveerd is met behulp van adeno-associated virus
Volgnummer	Type dierproef					
1	Vervaardiging van muizen waarin een bepaald gen of signaalroute geactiveerd of geïnactiveerd is met behulp van adeno-associated virus					

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Om specifieke genen in de muis tot overexpressie te brengen of te inactiveren zal gebruik worden gemaakt van adeno-associated virus (AAV). Met behulp van AAV kan genetisch materiaal worden ingebracht in diverse cellen van de muis. De adeno-associated virussen zullen worden gefabriceerd in samenwerking met een bedrijf. De AAV wordt via intraveneuze injectie bij de muis ingebracht. Het AAV serotype dat gebruikt wordt bepaald in welke weefsel het virus vooral terecht zal komen en waar overexpressie of inactivatie van het specifieke gen zal plaatsvinden. De primaire uitkomstparameter is de expressie van het betreffende gen in dit weefsel. Tenminste de volgende genen zouden we willen activeren of inactiveren: Angptl4, Slc25a47, Hlfpda, Vwa8, Angptl8. Van al deze genen is gedeeltelijk bekend of bestaat het vermoeden dat ze betrokken zijn bij het vet- en energiemetabolisme.

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

De behandeling bestaat uit eenmalige intraveneuze injectie van een specifiek AAV construct. Het volume van de injectie is 100 μ L. Er zullen ongeveer 2.5×10^{11} kopieën van het AAV worden geïnjecteerd per muis. Het virus is opgelost in PBS met 5% glycerol. Controle muizen zullen eenmalig worden geïnjecteerd met een controle AAV construct.

De werking van het AAV (dus de overexpressie of inactivatie van een specifiek gen) komt na 1-2 weken tot uiting en blijft gedurende maanden aanhouden.

Het weefsel waar een bepaald gen tot overexpressie moet worden gebracht bepaalt de keuze van het AAV serotype dat zal worden gebruikt. De keuze van het weefsel zal afhangen van: a) in welke weefsels komt het gen tot expressie; b) wat is de respons van het gen in verschillende weefsels op diverse stimuli zoals koude, vasten, hoogvetvoer, en fysieke inspanning; c) in welke mate en in welke weefsels wordt de expressie van het gen beïnvloed door obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten; d) welke overige relevante informatie over het gen is beschikbaar vanuit de literatuur.

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

B. De dieren

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; b) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten.

De dieren zullen worden gebruikt voor de dierproeven beschreven in bijlagen met volgnummer 2-6. Het benodigde aantal dieren wordt in elk van de onderdelen expliciet vermeld. Daarnaast is voor elk virus/gen een pilot nodig om te onderzoeken of het virus inderdaad de gewenste activatie of inactivatie teweeg brengt. Hiervoor zijn 4 muizen per virus nodig. We willen maximaal 25 verschillende virussen toepassen voor activatie of inactivatie van maximaal 25 verschillende genen. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 100.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Ja, de meeste dieren zullen worden gebruikt voor de dierproeven beschreven in de bijlagen met volgnummer 2-6. De dieren die worden gebruikt in de pilot om te onderzoeken of het virus inderdaad de gewenste activatie of inactivatie teweeg brengt zullen niet worden hergebruikt.

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: De injectie van muizen met AAV heeft als doel om specifieke genen tot overexpressie te brengen of te inactiveren, om vervolgens de rol van deze genen bij het energiemetabolisme op te helderen via blootstelling van de muizen aan diverse omstandigheden waarbij het metabolisme op de proef wordt gesteld. Voorbeelden zijn fysieke inspanning, koude, ondervoeding en overvoeding. Activatie of inactivatie van specifieke genen kan ook in-vitro worden uitgevoerd maar het is dan niet mogelijk de invloed vast te stellen van omstandigheden waarbij het energiemetabolisme van de muis op de proef wordt gesteld. Tevens kan in-vitro de rol van een gen bij de metabole interactie tussen diverse organen zoals vetweefsel, de lever en de spieren, niet worden vastgesteld. Om een goed beeld te krijgen van de rol van een bepaald

gen bij het energiemetabolisme tijdens fysieke inspanning is het werken met proefdieren dus noodzakelijk. De aanleiding om de genen verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een mogelijke rol van het gen in het energiemetabolisme suggereren. Wanneer een vraagstelling beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

Vermindering: de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken.

Verfijning: er is gekozen voor een methode waarbij volstaat dat de dieren een eenmalige injectie krijgen om langdurig een gen te activeren of inactiveren.

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

Geen

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de beoogde muizen van elders verkregen kunnen worden en/of al soortgelijke experimenten elders zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De intraveneuze injectie van het virus kan een zeer kortstondige pijn geven.

In verband met de korte duur van de injectie wordt geen verdoving of andere pijnverlichtingsmethode toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er is een kleine kans dat de activatie of inactivatie van bepaalde genen en signaalroutes ongerief zal veroorzaken.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De activatie of inactivatie van bepaalde genen zou mogelijk bepaalde pathologische processen kunnen bevorderen, wat gepaard zou kunnen gaan met ongerief.

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

De muizen zullen na toediening van het virus goed in de gaten worden gehouden.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief bestaat uit een eenmalige kortstondige intraveneuze injectie, wat als licht ongerief wordt geclassificeerd.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 2 | Hoogvetdieet als stressor voor ophelderen functie van genen |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het voeren van muizen met een voer dat rijk is aan vet is het meest gebruikte diermodel voor obesitas, NAFLD en insuline-ongevoeligheid. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd/geïnactiveerd dit vetrijke voer te geven kan de rol van dit gen of signaalroute bij het energiemetabolisme en bij bovengenoemde ziekten beter zichtbaar gemaakt worden. De primaire uitkomstparameters in de dierproef zijn gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, concentratie lipiden in plasma, en het aantal immuuncellen in het vetweefsel.

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.

Muizen zullen gedurende maximaal 20 weken een voer krijgen dat extra veel vet bevat (tussen de 45 en 60 energieprocent vet). 60 energieprocent vet wordt gebruikt om muizen zo snel mogelijk dik te maken. 45 energieprocent vet wordt gebruikt indien naast hoogvet ook andere componenten in de voeding (zoals bijvoorbeeld vezel of mineralen) worden gemoduleerd. Als gevolg van het hoogvetvoer ontwikkelen muizen obesitas, NAFLD en insuline-ongevoeligheid. Een controlegroep muizen krijgt voer dat weinig vet bevat (10 energieprocent). De voeders zijn commercieel beschikbaar en worden veelvuldig in de literatuur beschreven. Deze proefopzet is wereldwijd het meest gebruikte diermodel voor obesitas, NAFLD en insuline-ongevoeligheid. De unieke benadering en toegevoegde waarde in dit project is het combineren van het hoogvetvoer met activatie of inactivatie van geselecteerde genen waarvoor aanwijzingen bestaan dat ze een rol spelen bij het vet- en energiemetabolisme. Naast de hoeveelheid vet zal eventueel een andere component in de voeding of het drinkwater (bijvoorbeeld de hoeveelheid en type voedingsvezel,

de hoeveelheid suiker, de concentratie mineralen, een bepaalde metaboliet, of antibiotica) gevarieerd worden om de optimale voersamenstelling te bereiken om de effecten van activatie of inactivatie van geselecteerde genen te onderzoeken.

Tegen het einde van de proef worden bij de dieren testen afgenomen waaronder een glucosetolerantietest en insulinegevoeligheidstest. Hiermee kan de eventuele invloed van activatie of inactivatie van een bepaald gen of signaalroute op insulinegevoeligheid worden vastgesteld.

Bij een glucosetolerantietest worden in de ochtend muizen overgezet naar een schone kooi zonder voer maar met water. Na 5 uur zullen de dieren gewogen worden en vervolgens zal via een kleine incisie in de staart een kleine hoeveelheid bloed (<5uL) worden verzameld om glucose te meten. Meteen daarna zal intraperitoneaal glucose (1 mg/g lichaamsgewicht dmv. een steriele 20% oplossing) worden geïnjecteerd. Op tijdstip 15, 30, 60, 90, 120 en 150 minuten na injectie zal via dezelfde incisie bloed worden verzameld voor glucosemeting. De totale hoeveelheid bloed die op deze manier wordt afgenomen ligt beneden de 50 microliter. Na de meting op 150 minuten gaan de dieren terug in hun kooi met voer en water.

Bij een insulinegevoeligheidstest worden in de ochtend muizen overgezet naar een schone kooi zonder voer maar met water. Na 5 uur zullen de dieren gewogen worden en vervolgens zal via een kleine incisie in de staart een kleine hoeveelheid bloed (<5uL) worden verzameld om glucose te meten. Meteen daarna zal intraperitoneaal insuline (0.75 mU/g lichaamsgewicht) worden geïnjecteerd. Op tijdstip 15, 30, 45, 60 en 90 minuten na injectie zal via dezelfde incisie bloed worden verzameld voor glucosemeting. De totale hoeveelheid bloed die op deze manier wordt afgenomen ligt beneden de 50 microliter. Na de meting op 60 minuten gaan de dieren terug in hun kooi met voer en water.

De glucosetolerantietest en de insulinegevoeligheidstest zullen in dezelfde muizen worden afgenomen met een periode daartussen van minimaal 1 week.

Zowel het voer dat veel vet bevat als het voer dat weinig vet bevat zullen worden gegeven aan muizen waarin een bepaald gen en/of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd. Tevens zullen de voeders worden gegeven aan een controlegroep van muizen waarin dit gen en/of signaalroute niet is geactiveerd of geïnactiveerd. Een individuele dierproef met hoog en laag vet voer omvat dus minimaal 4 groepen (2 voergroepen X 2 typen muizen). Bovenop het hoogvetdieet kan eventueel ook een andere component in het voer (zoals bijvoorbeeld vezel of suiker, zie boven) gevarieerd worden wat tot uitbreiding van het aantal groepen zal leiden tot maximaal 8

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

B. De dieren

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) omdat een groot deel van de vrouwelijke muizen vaak wordt ingezet voor de fok van de muizen, zeker in het geval bij de specifieke muizenlijnen met geactiveerde of geïnactiveerde genen; b) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; c) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten.. De specifieke muizenlijnen waarbij bepaalde genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd zullen op diverse manieren worden verkregen: 1) aankopen via commerciële dierenlabs, zoals Jackson labs of Harlan, 2) muizenlijn is al beschikbaar in dierfaciliteit, 3) verkregen via samenwerking met een ander lab, 4) zelf vervaardigd (zie bijlage volgnummer 1).

Zoals boven al aangegeven bestaat een individuele dierproef met hoog en laag vet voer uit minimaal 4 en maximaal 8 diergroepen. Uitgaande van maximaal 12 muizen per groep komen we per individuele dierproef op maximaal 96 muizen. Binnen dit project willen we deze

experimentele opzet 10 keer toepassen. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 960.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: er zijn helaas geen goede in-vitro modellen beschikbaar voor obesitas, NAFLD en insuline-ongevoeligheid. Tevens kan de complexiteit van het energiemetabolisme maar in beperkte mate worden nagebootst in-vitro. Vooral de wisselwerking en communicatie tussen de organen bij het energiemetabolisme kan onvoldoende worden onderzocht via experimenten in cellen. Tenslotte is het niet mogelijk de primaire uitkomstparameters van de dierexperimenten (gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, concentratie lipiden in plasma, en aantal immuuncellen in het vetweefsel) te onderzoeken in in-vitro modelsystemen. De aanleiding om de genen en signaalroutes verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een mogelijke rol van het gen of de signaalroute in het energiemetabolisme suggereren. Wanneer een vraagstelling beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

Vermindering: de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Vermindering van het aantal proefdieren zal verder worden bereikt door de experimenten zo efficiënt mogelijk in te vullen, o.a. door hergebruik van controlegroepen (indien mogelijk).

Verfijning: de duur van de vastenperiode voor de insulinegevoeligheidstest en glucosetolerantietest wordt beperkt tot 5 uur, in tegenstelling tot wat in de literatuur gebruikelijk is (16 uur). Op grond van onze ervaringen is 5 uur voldoende om de gewenste metabole effecten te krijgen voor onze metingen. Daarnaast zal olfactorisch en auditief contact tussen de muizen te allen tijde worden mogelijk gemaakt, ook wanneer individuele huisvesting noodzakelijk blijkt, om het ongerief te verminderen.

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

De dieren zullen zoveel mogelijk samen gehuisvest worden (3-4 muizen per kooi) om het sociale welzijn van de dieren te optimaliseren, tot het moment waarop de muizen op een specifiek voer worden gezet (zie huisvesting en verzorging). Tevens zal kooiverrijking aanwezig zijn.

De muizen in een proef zullen dagelijks worden geobserveerd om eventuele pijn of lijden tijdig op te merken en de noodzakelijke maatregelen te nemen, inclusief toepassen van humane eindpunten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De muizen zullen individueel worden gehuisvest vanaf het moment waarop de muizen op een specifiek voer worden gezet vanwege de volgende redenen: a) om de individuele voerinname te kunnen vaststellen; b) om per muis de ontlasting te kunnen verzamelen voor bijvoorbeeld analyse van de hoeveelheid vet; c) omdat het toewijzen van de verschillende muizen aan de verschillende voergroepen via randomisatie verloopt, waardoor de kans groot is dat bestaande nesten ontwricht worden. Het gezamenlijk huisvesten van onbekende mannetjes is ongewenst vanwege het grote risico dat ze gaan vechten.

Om ongerief als gevolg van de individuele huisvesting te verminderen zal auditief en olfactorisch contact mogelijk worden gemaakt. Er zal worden gebruik gemaakt van kooiverrijking in de vorm van tissues en andere attributen.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De glucosetolerantietest en de insulinegevoeligheidstest vereisen een eenmalige intraperitoneale injectie, gevolgd door een zestal bloedafnames (<5 uL) via de staart, wat matig ongerief veroorzaakt.

Vanwege de korte duur van de injectie wordt geen verdoving of andere pijnverlichtingsmethode toegepast.

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

Op het eind van de proef zal bloed afgenomen worden via orbitapunctie. Deze handeling zal onder isofluraan verdoving worden uitgevoerd. Om te garanderen dat de muizen volledig onder narcose zijn, zal in de gaten worden gehouden of de muizen reageren op prikkels van buitenaf.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het geven van voer dat veel of weinig vet bevat zal geen pijn veroorzaken en zorgt ook niet voor ongerief voor de muizen. Ook het veranderen van andere componenten in de voeding zoals vezel, suiker, mineralen, of een bepaalde metaboliet zal geen ongerief veroorzaken. Er is een hele kleine kans dat de combinatie van hoogvetvoer met activatie of inactivatie van een bepaald gen of signaalroute tot gezondheidsproblemen leidt en er bestaat een nog kleinere kans dat een situatie ontstaat waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen.

In dat laatste geval worden de volgende criteria gehanteerd. Indien de dieren in elkaar gedoken zitten en pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/of als ze niet meer reageren op prikkels zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Eveneens in het geval het lichaamsgewicht onverklaarbaar is afgenomen met meer dan 15% binnen twee dagen.

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

De kans dat humane eindpunten zullen moeten worden toegepast is bijzonder klein (<1%).

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief bestaat uit een glucosetolerantietest en insulinegevoeligheidstest (beiden vereisen een korte periode van vasten vòòr de testen worden uitgevoerd, een eenmalige intraperitoneale injectie en een zestal bloedafnames via de staart), en bloedverzameling via de orbita onder verdoving aan het einde van de proef gevolgd door euthenasie via cervicale dislocatie. Verder kan er sprake zijn van ongerief als gevolg van individuele huisvesting. Cumulatief wordt het ongerief geschat op matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van de proef worden de dieren opgeofferd om diverse weefsels te verzamelen. De aard van de primaire eindpunten (gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, concentratie plasma lipiden, aantal immuuncellen in het vetweefsel) vereist dat de dieren worden opgeofferd. De weefsels die verzameld worden zullen worden gebruikt voor talloze aanvullende analyses: histologie, biochemische bepalingen, moleculaire analyses etc. Deze analyses zijn essentieel om de vraagstelling van de proef te kunnen beantwoorden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	<input style="width: 100%;" type="text"/>	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	<input style="width: 100%;" type="text" value="Wageningen University"/>	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<input style="width: 100%;" type="text" value="3"/>	<input style="width: 100%;" type="text" value="Vasten als stressor voor ophelderen functie van genen"/>

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vasten is een belangrijke evolutionaire prikkel geweest voor zowel mens als dier. Tijdens vasten wordt de energiestofwisseling op de proef gesteld. Zo schakelt het dier over op vetverbranding en wordt de aanmaak van glucose gestimuleerd. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd/geinactiveerd te vasten kan de rol van dit gen of signaalroute bij het energiemetabolisme vaak veel beter zichtbaar gemaakt worden. De primaire uitkomstparameters in de dierproef zijn gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, concentratie van lipiden en glucose in plasma.

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

Tijdens vasten vinden er geleidelijke veranderingen in het energiemetabolisme plaats. Na 5-6 uur vasten is al het voedsel opgenomen en bevindt het lichaam zich in de zogenaamde early post-absorptive toestand. De lever bevat nog ruim voldoende glycogeen en het plasmagehalte vrije vetzuren is licht verhoogd. Na 16-24 uur vasten (zogenaamde late post-absorptive toestand) zijn de veranderingen min of meer stabiel waarbij de vetverbranding en de afbraak van het vetweefsel maximaal zijn. De glycogeenvoorraden in de lever zijn vrijwel uitgeput en het plasmagehalte van vrije vetzuren is sterk verhoogd. De maximale duur van vasten wordt daarom vastgelegd op 24 uur (fasted state). Tijdens vasten hebben de dieren wel ad libitum toegang tot drinkwater.

Een metabool tegenovergestelde toestand (fed state: volle glycogeenvoorraden in lever, maximale vetopbouw) wordt bereikt aan het eind van de donkerperiode wanneer de dieren ad libitum toegang hebben tot voer en water. Deze fed state dient als vergelijking/referentie.

Muizen waarin een bepaald gen en/of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd zullen worden onderworpen aan een periode van 6 of 24 uur vasten of blijven ad libitum toegang hebben tot voer en water. Een controlegroep van muizen waarin dit gen en/of signaalroute niet is geactiveerd of geïnactiveerd zal dezelfde behandelingen ondergaan. Een individuele dierproef met vasten omvat dus minimaal 6 groepen (3 metabole toestanden X 2 typen muizen).

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

B. De dieren

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) omdat een groot deel van de vrouwelijke muizen vaak wordt ingezet voor de fok van de muizen; b) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; c) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten. De specifieke muizenlijnen waarbij bepaalde genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd zullen op diverse manieren worden verkregen: 1) aankopen via commerciële dierenlabs, zoals Jackson labs of Harlan, 2) muizenlijn is al beschikbaar in dierfaciliteit, 3) verkregen via samenwerking met een ander lab, 4) zelf vervaardigd (zie bijlage volgnummer 1).

Zoals boven al aangegeven bestaat een individuele dierproef waarbij dieren gevestigd worden uit 6 diergroepen. Uitgaande van maximaal 12 muizen per groep komen we per individuele dierproef op 72 muizen. Binnen dit project willen we deze experimentele opzet 10 keer toepassen. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 720.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: de metabole reactie op vasten is een zeer complexe respons waarbij talloze hormonen en andere signaalstoffen betrokken zijn. Om die reden kan de respons op vasten maar in heel beperkte mate worden nagebootst in-vitro. Vooral de wisselwerking en communicatie tussen de organen bij het energiemetabolisme kan onvoldoende worden onderzocht via experimenten in cellen. Tenslotte is het niet mogelijk de primaire uitkomstparameters van de dierexperimenten (gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, en concentratie lipiden en glucose in plasma) te onderzoeken in in-vitro modelsystemen. De aanleiding om de genen en signaalroutes verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een mogelijke rol van het gen of de signaalroute in het energiemetabolisme suggereren. Wanneer een vraagstelling

beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

Vermindering: de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Vermindering van het aantal proefdieren zal verder worden bereikt door de experimenten zo efficiënt mogelijk in te vullen, o.a. door hergebruik van controlegroepen (indien mogelijk).

Verfijning: de duur van de vastenperiode wordt beperkt tot maximaal 24 uur. In de literatuur wordt regelmatig een vastenperiode van 48 uur of zelfs 72 uur beschreven. De toegevoegde waarde van één of twee extra dagen vasten is beperkt.

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

De dieren zullen samen gehuisvest worden (3-4 muizen per kooi) om het sociale welzijn van de dieren te optimaliseren. Tevens is kooiverrijking aanwezig. De muizen in een vastenproef zullen om de 4-5 uur, inclusief 's nachts, worden geobserveerd om eventuele pijn of lijden tijdig op te merken en de noodzakelijke maatregelen te nemen, inclusief toepassen van humane eindpunten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Op het eind van de proef zal bloed afgenomen worden via orbitapunctie. Deze handeling zal onder isofluraan verdoving worden uitgevoerd. Om te garanderen dat de muizen volledig onder narcose zijn, zal in de gaten worden gehouden of de muizen reageren op prikkels van buitenaf.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Hoewel vasten geen pijn veroorzaakt bij muizen kan het wel voor ongerief zorgen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het onthouden van voer zorgt voor honger bij de muizen en daarmee ongerief.

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

Om het ongerief zo veel mogelijk te beperken zal de vastenperiode worden beperkt tot maximaal 24 uur.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Er is een hele kleine kans dat de combinatie van vasten met activatie of inactivatie van een bepaald gen of signaalroute tot gezondheidsproblemen leidt en er bestaat een nog kleinere kans dat een situatie ontstaat waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen.

In dat laatste geval worden de volgende criteria gehanteerd. Indien de dieren in elkaar gedoken zitten en pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/of als ze niet meer reageren op prikkels zullen de dieren worden geëuthanaseerd.

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

De kans dat humane eindpunten zullen moeten worden toegepast is bijzonder klein (<1%).

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief bestaat uit vasten variërend in duur van 6 of 24 uur. De mate van ongerief wordt ingeschat op gering tot matig, afhankelijk van de duur van vasten. Bloed zal onder verdoving verzameld worden via orbitapunctie gevolgd door euthenasie via cervicale dislocatie. Cumulatief wordt het ongerief ingeschat op matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van de proef worden de dieren opgeofferd om diverse weefsels te verzamelen. De aard van de primaire eindpunten (gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, concentratie lipiden en glucose in plasma) vereist dat de dieren worden opgeofferd. De weefsels die verzameld worden zullen worden gebruikt voor talloze aanvullende analyses: histologie, biochemische bepalingen, moleculaire analyses etc. Deze analyses zijn essentieel om de vraagstelling van de proef te kunnen beantwoorden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 4 | Koudeblootstelling als stressor voor ophelderen functie van genen |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het blootstellen van muizen aan een koude omgevingstemperatuur is een veelgebruikt model om activatie van het zogenaamde bruine vet te bewerkstelligen. Bruin vet is een orgaan met de capaciteit om energie (en dus calorïën) om te zetten in warmte. Dit wordt ook wel thermogenese genoemd. De activatie van bruin vet door koudeblootstelling zorgt, naast veranderingen in het bruin vet zelf, voor grote veranderingen in het energiemetabolisme van andere organen. Zo wordt tijdens koude de vetafbraak in het witte vetweefsel sterk geactiveerd. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan koude kan de rol van dit gen of signaalroute in het energiemetabolisme beter zichtbaar gemaakt worden. De primaire uitkomstparameters zijn lichaamstemperatuur, het gewicht van diverse vetdepots, concentratie van lipiden in plasma, histologie van het bruin vet en de expressie van verschillende genen in bruin en wit vet.

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

De muizen zullen gedurende minimaal 8 uur en maximaal 10 dagen blootgesteld worden aan een koude omgevingstemperatuur (5-7 graden Celsius). Bij een korte periode van koudeblootstelling behoudt het dier zijn lichaamswarmte voornamelijk door spieractiviteit maar tegelijkertijd worden al diverse processen in het bruine vet in gang gezet. Het dier maakt vooral gebruik van bestaande vetvoorraden als energiebron. Bij langdurige koudeblootstelling behoudt het dier zijn lichaamswarmte voornamelijk via thermogenese en is het bruine vet maximaal geactiveerd. De vetvoorraden zijn grotendeels uitgeput en het dier verkrijgt extra energie door een sterk verhoogde voerinname. Er is gekozen voor een koude omgevingstemperatuur van 5-7 graden

Celsius omdat bekend is dat muizen een temperatuurverandering van 15 graden Celsius kunnen verdragen. Bij een grotere temperatuursverandering ontstaat het risico dat muizen niet meer in staat zijn hun lichaamstemperatuur te handhaven. Met een normale omgevingstemperatuur van ongeveer 20-22 graden Celsius komen we daarom uit op 5-7 graden Celsius. Een controlegroep muizen zal worden blootgesteld aan een omgevingstemperatuur waar bruin vet in het geheel niet geactiveerd wordt (thermoneutrale temperatuur, 28-30 graden Celsius). Door muizen met sterke bruinvetactivatie te vergelijken met muizen met geen bruinvetactivatie, kan het effect van een bepaald gen of bepaalde signaalroute op het energiemetabolisme na kortstondige of langdurige bruinvetactivatie optimaal geanalyseerd worden. Deze opzet is veelgebruikt in literatuur en meerdere malen met succes toegepast in onze onderzoeksgroep.

Voor aanvang van de proef zal subcutaan in de flank een speciale chip worden geplaatst waarmee vervolgens met een uitleesapparaat op afstand de lichaamstemperatuur non-invasief kan worden vastgesteld.

Ten tijde van een langdurige koudeblootstelling kan maximaal éénmaal per 24 uur, en niet vaker dan driemaal per 5 dagen, een kleine hoeveelheid bloed worden afgenomen via staartbloeding (<25 uL). Dit wordt gedaan om de reactie van de muizen op koudeblootstelling zo goed mogelijk in kaart te brengen door verschillende plasmaparameters te analyseren, en daardoor de rol van een bepaald gen en/of signaalroute optimaal te onderzoeken.

Koudeblootstelling en het plaatsen van muizen op thermoneutrale temperatuur zal worden uitgevoerd met muizen waarin een bepaald gen en/of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd, alsmede in een controlegroep muizen waarin dat bepaalde gen en/of signaalroute NIET is geactiveerd of geïnactiveerd. Een individuele dierproef bestaat dus uit 8 groepen (2 tijdstippen X 2 omgevingstemperaturen X 2 typen muizen).

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

B. De dieren

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) omdat een groot deel van de vrouwelijke muizen vaak wordt ingezet voor de fok van de muizen; b) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; c) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten. De specifieke muizenlijnen waarbij bepaalde genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd zullen op diverse manieren worden verkregen: 1) aankopen via commerciële dierenlabs, zoals Jackson labs of Harlan, 2) muizenlijn is al beschikbaar in dierfaciliteit, 3) verkregen via samenwerking met een ander lab, 4) zelf vervaardigd (zie bijlage volgnummer 6).

Zoals hierboven aangegeven bestaat een individuele dierproef met koudeblootstelling uit 8 groepen. Uitgaande van maximaal 12 muizen per groep komen we per individuele dierproef op maximaal 96 muizen. Binnen dit project willen we deze experimentele opzet 8 keer toepassen. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 768.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

geacht.

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: De metabole veranderingen die optreden in o.a. bruin vetweefsel ten tijde van koudeblootstelling zijn een resultaat van de interactie tussen meerdere organen, waaronder de hersenen, bruin en wit vetweefsel. Deze interactie tussen verschillende organen kan helaas nog niet in-vitro worden nagebootst. Om een goed beeld te krijgen van de rol van een bepaald gen en/of signaalroute in het energiemetabolisme ten tijde van koudeblootstelling is het werken met proefdieren dus noodzakelijk. De aanleiding om de genen en signaalroutes verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een mogelijke rol van het gen of de signaalroute in het energiemetabolisme suggereren. Wanneer een vraagstelling beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

Vermindering: de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Vermindering van het aantal proefdieren zal verder worden bereikt door de experimenten zo efficiënt mogelijk in te vullen, o.a. door hergebruik van controlegroepen op thermoneutrale temperatuur (indien mogelijk).

Verfijning: De lichaamstemperatuur van de muizen wordt gemeten door middel van een vooraf geïmplanteerde chip. Dit voorkomt dat de lichaamstemperatuur van de muizen gemeten moet worden via het rectum, hetgeen veel stress voor de muizen met zich meebrengt. Het inbrengen van de chips voor het aflezen van de lichaamstemperatuur wordt gedaan onder een licht isofluraanroesje om het ongerief (voornamelijk stress) van de muizen te verminderen.

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

Voor de koudeblootstellingsproeven moeten de muizen individueel gehuisvest worden. Dit is essentieel omdat muizen in een koudere omgeving de neiging hebben om elkaar warm te gaan houden wat het effect van de proef zou kunnen beïnvloeden. Om ongerief zo veel mogelijk te verminderen zal olfactorisch en auditief contact tussen de dieren worden mogelijk gemaakt. Ook zal kooiverrijking aanwezig zijn, zodat ook de muizen die aan koude worden blootgesteld aan normale nestvorming kunnen doen.

Het is mogelijk dat bepaalde muizengroepen een slechtere adaptatie tot de kou hebben, wat uiteindelijk kan leiden tot een sterke daling in hun lichaamstemperatuur. Overigens is op basis van literatuur de kans zeer klein dat muizen niet met koudeblootstelling om kunnen gaan. Om mogelijk ongerief op te merken zal de lichaamstemperatuur van de muizen worden gemeten door middel van een vooraf geïmplanteerde thermosensorchip. Op deze manier kunnen de muizen goed gevolgd worden en direct uit de proef gehaald worden wanneer zij een slechte adaptatie vertonen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

waarom duplicatie noodzakelijk is.

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De muizen zullen individueel worden gehuisvest vanaf het moment waarop de muizen aan koude of warmte zullen worden blootgesteld vanwege de volgende redenen: a) om de individuele voerinnamen te kunnen vaststellen; b) omdat het toewijzen van de verschillende muizen aan de verschillende voergroepen via randomisatie verloopt, waardoor de kans groot is dat bestaande nesten ontwricht worden; c) omdat muizen wanneer gehuisvest in groepen de neiging hebben om elkaar warm te gaan houden, wat het effect van een koudeblootstelling zou kunnen beïnvloeden.

Om ongerief als gevolg van de individuele huisvesting te verminderen zal auditief en olfactorisch contact mogelijk worden gemaakt. Er zal worden gebruik gemaakt van kooiverrijking in de vorm van tissues en andere attributen.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De bloedafnames kunnen enige pijn veroorzaken, maar vanwege de korte duur van de bloedafnames wordt geen verdoving of andere pijnverlichtingsmethode toegepast.

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

Het implanteren van een thermosensorchip geschiedt onder verdoving waarmee pijn wordt voorkomen.

Op het eind van de proef zal bloed afgenomen worden via orbitapunctie. Deze handeling zal onder isofluraan verdoving worden uitgevoerd. Om te garanderen dat de muizen volledig onder narcose zijn, zal in de gaten worden gehouden of de muizen reageren op prikkels van buitenaf.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Voor de koudeblootstellingsproeven moeten de muizen individueel gehuisvest worden, wat tegen de natuur van muizen, zijnde sociale dieren, ingaat. Daarnaast kan koudeblootstelling gedurende de eerste dag als onprettig worden ervaren door de muizen. Zij zullen bijvoorbeeld door de lagere omgevingstemperatuur de eerste dag minder actief zijn en proberen zichzelf warm te houden door in de bedding te kruipen. Door de interne adaptaties die optreden zijn de muizen snel gewend aan de koude en vertonen daarbij normaal gedrag, behalve dat ze meer gaan eten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Individuele huisvesting is essentieel omdat muizen in een koudere lichaamsomgeving de neiging hebben om elkaar warm te gaan houden wat het effect van de proef zou kunnen beïnvloeden. Om geen systematisch verschil in sociale omgeving te introduceren tussen de muizen die wel en niet aan koude worden blootgesteld moeten ook de muizen die bij 28 graden geplaatst zullen worden individueel worden gehuisvest.

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

Om ongerief zo veel mogelijk te verminderen zal olfactorisch en auditief contact tussen de dieren worden mogelijk gemaakt. Om het ongerief van zowel de individuele huisvesting en de koudeblootstelling te verlagen zal een ruime hoeveelheid kooiverrijking aanwezig zijn, zodat alle muizen aan normale nestvorming kunnen doen.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Er is een hele kleine kans dat de combinatie van koudeblootstelling met activatie of inactivatie van een bepaald gen of signaalroute tot een sterke afname in lichaamstemperatuur leidt. Hoewel in de literatuur maar zeer weinig muismodellen bekend zijn waar een dergelijke daling in lichaamstemperatuur gezien wordt, kan deze mogelijkheid niet uitgesloten worden. Om deze reden worden de muizengroepen die aan koude worden blootgesteld geïnjecteerd met thermosensorchips om de lichaamstemperatuur goed te kunnen monitoren. Om er voor te zorgen dat de muizen geen onnodig ongerief ondervinden wanneer zij zich slecht aanpassen aan een lage omgevingstemperatuur, zullen muizen worden gedood wanneer hun lichaamstemperatuur onder de 19 graden Celsius komt. Uit onderzoek is gebleken dat 16-19 graden Celsius het "point of no return" is waarbij de muis niet meer erin slaagt de lichaamstemperatuur vast te houden. We hebben voor de bovengrens gekozen omdat bij het bereiken van die temperatuur al duidelijk is dat de thermoregulatie ernstig verstoord is en we extra ongerief willen vermijden. Op het moment dat het vermoeden bestaat dat bepaalde muizen zich slecht aanpassen (lage lichaamstemperatuur, onbeweeglijk zitten in de kooi en niet responsief op een externe stimulus) zal hun lichaamstemperatuur zeer regelmatig worden afgelezen en zal hun welzijn extra in de gaten worden gehouden. Wanneer een lage lichaamstemperatuur gecombineerd wordt met in elkaar gedoken zitten en/of pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/of het niet meer reageren op prikkels, zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Dit zal ook het geval zijn wanneer het lichaamsgewicht van de dieren met meer dan 15% afneemt binnen twee dagen.

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

De kans dat humane eindpunten zullen moeten worden toegepast is bijzonder klein (<1%).

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief voor muizen blootgesteld aan thermoneutrale temperatuur is gesteld op licht. Deze muizen kunnen negatieve effecten ondervinden van mogelijke tussentijdse bloedafname, de individuele huisvesting, en orbitapunctie onder anesthesia gevolgd door euthenasie via cervicale dislocatie. Bij deze muizen zal geen thermosensorchip worden ingebracht.

Het ongerief voor de muizen blootgesteld aan koude is matig. Deze muizen kunnen negatieve effecten ondervinden van mogelijke tussentijdse bloedafname, inbrengen van de thermosensorchip, individuele huisvesting, de lage omgevingstemperatuur, en orbitapunctie onder anesthesia gevolgd door euthenasie via cervicale dislocatie.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van de proef worden de dieren opgeofferd om diverse weefsels te verzamelen. De aard van de primaire eindpunten (het gewicht van diverse vetdepots, concentratie van plasma lipiden, histologie van het bruin vet en de expressie van verschillende genen in bruin en wit vet) vereist dat de dieren worden opgeofferd. De weefsels die verzameld worden zullen worden gebruikt voor talloze aanvullende analyses: histologie, biochemische bepalingen, moleculaire analyses etc. Deze analyses zijn essentieel om de vraagstelling van de proef te kunnen beantwoorden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.		
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	5	Activatie van het immuunsysteem als stressor voor ophelderen functie van genen en pathways

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Naast een sterke toename van vetmassa ontwikkelen mensen met overgewicht een chronische milde ontsteking. In het bloed van individuen met overgewicht is de concentratie van tal van ontstekingsparameters verhoogd. Deze ontstekingsparameters spelen waarschijnlijk een rol bij de ontwikkeling van hart- en vaatziekten en type 2 diabetes. Enerzijds leidt activatie van het immuunsysteem tot grote veranderingen in de energiestofwisseling van verschillende weefsels. Anderzijds kunnen veranderingen in energiestofwisseling op hun beurt weer leiden tot activatie van het immuunsysteem. Deze interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme willen we beter in kaart brengen, waarbij in het bijzonder de aandacht uitgaat naar de interacties tussen immuuncellen en cellen die een belangrijke rol spelen in het energiemetabolisme (zoals vetweefsel- of levercellen). Door een belangrijke functie van immuuncellen te remmen of immuuncellen juist te activeren in obese muizen – wat bereikt wordt door de muizen een hoogvetvoer te geven zoals beschreven in experiment/onderdeel 1 – kan inzicht vergaard worden in de rol van het immuunsysteem bij de ontwikkeling van aan obesitas gekoppelde complicaties. In dit type experiment kan de rol van bepaalde genen of signaalroutes in de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme achterhaald worden door muizen waarin dit bepaalde gen of deze bepaalde signaalroute is geïnactiveerd of geactiveerd, bloot te stellen aan stoffen die het immuunsysteem beïnvloeden. De primaire uitkomstparameters zullen verschillende ontstekingsfactoren en immuuncellen in het bloed en metabole organen zoals de lever en het vetweefsel zijn, alsmede metabole parameters in het bloed.

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.

Om inzicht te vergaren in de interacties tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme zullen cellen van het immuunsysteem op verschillende manieren worden gemanipuleerd. Dit kan door (een functie van) het immuunsysteem te activeren of juist te inactiveren. Voorbeelden hiervan zijn een activatie van het immuunsysteem middels een component van het celmembraan van gram-negatieve bacteriën: lipopolysaccharide (LPS), of een inactivatie van een belangrijke functie van immuuncellen, zoals fagocytose, door middel van BMS-777607. Dergelijke stoffen zullen oraal worden toegediend (via het voer, drinkwater, of orale gavage), of zullen intraveneus of intraperitoneaal ingespoten worden. Afhankelijk van de aard en werking van de stof zullen de dieren eenmalig of meerdere dagen aan de stof blootgesteld worden en zal de stof hierbij dagelijks of met tussenposen gegeven worden. Ter vergelijking zal naast elke behandeling ook een controle behandeling gegeven worden bestaande uit enkel de matrix waarin bovengenoemde stoffen worden toegediend.

Naast het manipuleren van de activiteit van het immuunsysteem, is het van belang het gedrag en functioneren van immuuncellen in kaart te brengen om de interacties tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme verder te doorgronden. Speciale aandacht gaat hierin uit naar het vetweefsel, waar interactie tussen bepaalde immuuncellen (macrofagen) en vetcellen vergaande gevolgen lijkt te hebben voor de ontwikkeling van ontsteking in het vetweefsel en hiermee een belangrijke rol heeft in de ontwikkeling van systemische ontsteking bij obesitas. Het vetweefsel bevat veel verschillende soorten cellen. Om het gedrag van een specifiek type immuuncel, de macrofaag, goed te kunnen onderzoeken zullen gelabelde cellen eenmalig intraperitoneaal of intraveneus geïnjecteerd worden. Op deze manier kunnen deze cellen gemakkelijk terug gevonden worden in de totale populatie cellen in het vetweefsel en zodoende kan het fenotype van deze cel na interacties met vetcellen en andere (immuun)cellen in het vetweefsel in kaart gebracht worden. De gelabelde cellen zullen door middel van celkweek worden gegenereerd en zijn oorspronkelijk op diverse manieren verkregen, waaronder aankoop, donatie door collegaonderzoekers, of het zelf verzamelen uit de botten van kadavers. Hierbij is in geen van de gevallen sprake van ongerief.

Omdat de interactie tussen het immuunsysteem en cellen die een belangrijke rol spelen in de energiestofwisseling van organen juist tijdens de ontwikkeling van obesitas een belangrijke rol lijkt te spelen, zullen bovenbeschreven behandelmethoden mogelijk samen gaan met een dieetinterventie waarin muizen maximaal 20 weken een voer krijgen dat extra veel vet bevat (tussen de 45 en 60 energieprocent vet). De muizen ontwikkelen daardoor obesitas, NAFLD en insuline ongevoeligheid. Daarbij wordt een controlegroep van muizen meegenomen die voer krijgt wat weinig vet bevat (10 energieprocent).

De stoffen die het immuunsysteem moduleren zullen gegeven worden aan muizen op een laagvetdieet en/of hoogvetdieet waarbij mogelijk tevens een bepaald gen en/of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd. Daarbij wordt een controle groep van wildtype muizen meegenomen. Een individuele dierproef met een groep die wel of geen immunomodulerende stof ontvangt omvat aldus maximaal 8 groepen (2 behandelgroepen X 2 typen muizen X 2 typen voer). Waar mogelijk zal worden gecombineerd met experimenten zoals beschreven in onderdeel 1 om de aantallen proefdieren zoveel mogelijk te beperken.

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

B. De dieren

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) omdat een groot deel van de vrouwelijke muizen vaak wordt ingezet voor de fok van de muizen; b) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; c) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten. De specifieke muizenlijnen waarbij bepaalde genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd zullen op diverse manieren worden verkregen: 1) aankopen via commerciële dierenlabs, zoals Jackson labs of Harlan, 2) muizenlijn is al beschikbaar in dierfaciliteit, 3) verkregen via samenwerking met een ander lab, 4) zelf vervaardigd (zie bijlage volgnummer 1). Zoals boven al aangegeven is bestaat een individuele dierproef waarin immunomodulerende stoffen toegediend worden uit maximaal 8 groepen. Uitgaande van maximaal 12 muizen per groep komen we per individuele dierproef op maximaal 96 muizen. Binnen dit project willen we deze experimentele opzet 8 keer toepassen. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 768.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: De interacties tussen immuuncellen en de energiestofwisseling in verschillende metabool actieve organen zoals het vetweefsel en de lever zijn niet in-vitro te onderzoeken. Meerdere organen en verschillende (combinaties van) immuuncellen spelen een rol in deze wisselwerking, wat het vrijwel onmogelijk maakt om dit in-vitro na te bootsen. Ook lenen de primaire uitkomstparameters van de dierexperimenten (concentratie ontstekingsfactoren en aantallen immuuncellen in het bloed en in metabole organen zoals de lever en het vetweefsel) zich minder goed voor onderzoek met behulp van in-vitro modelsystemen. De aanleiding om de genen en signaalroutes verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een vermoedelijke rol van het gen of de signaalroute bij immuuncelfunctie of energiemetabolisme hebben blootgelegd. Wanneer een vraagstelling beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

Vermindering: de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Vermindering van het aantal proefdieren zal verder worden bereikt door de experimenten zo efficiënt mogelijk in te vullen, o.a. door hergebruik van controlegroepen (indien mogelijk), bijvoorbeeld door te combineren met experimenten zoals beschreven in onderdeel 1 (hoogvetvoer).

Verfijning: De duur en frequentie alsmede de wijze van toediening van immunomodulerende stoffen of cellen zullen zo bepaald worden dat het beoogde resultaat behaald wordt met zo gering mogelijk ongerief. Uit ethisch oogpunt, maar ook omdat ongerief in de dieren de interacties tussen het immuunsysteem en

energiestofwisseling kan verstoren, zal het ongerief te allen tijde zo gering mogelijk gehouden worden. De stoffen die worden toegediend zullen hooguit een milde ontsteking veroorzaken.

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

De dieren zullen zoveel mogelijk samen gehuisvest worden (3-4 muizen per kooi) om het sociale welzijn van de dieren te optimaliseren. Tevens is kooiverrijking aanwezig. Alleen wanneer de huisvesting met meerdere muizen in een kooi botst met de doelstellingen van de proef zal op individuele huisvesting worden overgegaan.

De muizen in een proef zullen dagelijks worden geobserveerd om eventuele pijn of lijden tijdig op te merken en de noodzakelijke maatregelen te nemen, inclusief toepassen van humane eindpunten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Er kan worden gekozen voor individuele huisvesting: a) om de individuele voeriname te kunnen vaststellen omdat de behandeling daarop invloed zou kunnen hebben; b) omdat het toewijzen van de verschillende muizen aan de verschillende behandeling en voergroepen via randomisatie verloopt, waardoor de kans groot is dat bestaande nesten ontwricht worden.

Om ongerief als gevolg van de individuele huisvesting te verminderen zal auditief en olfactorisch contact mogelijk worden gemaakt. Er zal worden gebruik gemaakt van kooiverrijking in de vorm van tissues en andere attributen.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Het toedienen van stoffen die op het immuunsysteem inwerken of een injectie van gelabelde cellen zal lichte pijn kunnen veroorzaken door de toediening zelf (via orale gavage, intraveneuze of intraperitoneale injectie) en een mogelijk milde ontsteking door de werking van de stoffen. Deze ontsteking zal maximaal 24 uur duren.

In verband met de korte duur van de injectie en orale gavage wordt geen verdoving of andere pijnverlichtingsmethode toegepast. De milde ontsteking die kan worden geïnduceerd na toediening van de stoffen (en in veel gevallen niet zal ontstaan) zal van korte duur zijn en matig ongerief veroorzaken. Er worden in deze gevallen dan ook geen pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast.

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

Op het eind van de proef zal bloed afgenomen worden via orbitapunctie. Deze handeling zal onder isofluraan verdoving worden uitgevoerd. Om te garanderen dat de muizen volledig onder narcose zijn, zal in de gaten worden gehouden of de muizen reageren op prikkels van buitenaf.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In alle gevallen zal de minimale behandelingsduur en frequentie worden aangehouden waarbij op basis van literatuur of eigen bevinding de beoogde modulatie van het immuunsysteem behaald wordt. Hierdoor is er een erg kleine kans dat er omstandigheden ontstaan waarbij ernstig lijden en humane eindpunten toegepast dienen te worden om verder lijden te voorkomen.

Mocht er zich wel een dergelijke situatie voordoen, dan worden de volgende criteria gehanteerd. Indien de dieren in elkaar gedoken zitten en pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/of als ze niet meer reageren op prikkels zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Eveneens in het geval het lichaamsgewicht met meer dan 15% is afgenomen in twee dagen tijd.

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

Aangezien altijd de minimale behandelingsduur en frequentie zal worden aangehouden waarbij op basis van literatuur of eigen bevinding de beoogde modulatie van het immuunsysteem behaald wordt, is de kans dat humane eindpunten zullen moeten worden toegepast relatief klein. Deze kans wordt ingeschat op <5%.

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief bestaat uit toediening van bepaalde immuunactiverende of –remmende stoffen of cellen middels orale toediening, intra peritoneale of intraveneuze injectie. Zowel de toedieningsmethoden als de milde ontsteking die mogelijk ontstaat door de werking van de stoffen wordt als matig ongerief ingeschat. Bloed zal onder verdoving verzameld worden via de orbitapunctie waarna de muizen worden geëuthanaseerd door cervicale dislocatie. Cumulatief wordt het ongerief ingeschat op matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van de proef worden de dieren opgeofferd om diverse weefsels te verzamelen. De aard van de primaire uitkomstparameters (ontstekingsfactoren en immuuncellen in het bloed en metabole organen) vereist dat de dieren worden opgeofferd. De weefsels die verzameld worden zullen tevens worden gebruikt voor talloze aanvullende analyses: histologie, biochemische bepalingen, moleculaire analyses etc. Deze analyses zijn essentieel om de vraagstelling van de proef te kunnen beantwoorden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.					
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Wageningen University				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">Volgnummer</th> <th style="width: 85%;">Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">6</td> <td>Fysieke inspanning als stressor voor ophelderen functie genen</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	6	Fysieke inspanning als stressor voor ophelderen functie genen
Volgnummer	Type dierproef					
6	Fysieke inspanning als stressor voor ophelderen functie genen					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het blootstellen van muizen aan fysieke inspanning is een veelgebruikt model om het energiemetabolisme in de spier en andere weefsels te stimuleren. Tijdens fysieke inspanning wordt lichaamsvet afgebroken om als energiebron te fungeren. Het vet wordt opgenomen in de spieren om daar via oxidatieve processen te worden afgebroken tot kooldioxide en water. Hierbij komt veel energie vrij die door de spieren gebruikt wordt om samen te trekken en werk te verrichten. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan fysieke inspanning kan de rol van dit gen of signaalroute in het energiemetabolisme beter zichtbaar gemaakt worden. De primaire uitkomstparameters zijn maximaal loopvermogen, concentratie van lipiden en glucose in plasma, en de expressie van verschillende genen in spierweefsel.

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

De muizen zullen eerst vertrouwd worden gemaakt met de loopband door hen een drietal opeenvolgende dagen gedurende 15 minuten op de loopband te plaatsten met een loopsnelheid van 8 m per minuut. Bij deze snelheid loopt de muis en hoeft de muis niet te rennen.

Op de testdag worden de muizen gevast gedurende 5 uur. Vervolgens worden de dieren aan een inspanningsprotocol onderworpen op de loopband. Twee typen inspanningsprotocollen zullen worden uitgevoerd.

Duurprotocol:

De muizen zullen eerst een warming-up doen van 15 min met een snelheid van 12 m/min. Dit komt overeen met ongeveer 50% van de maximale capaciteit. Vervolgens rennen de muizen gedurende twee uur met een snelheid van 14 m/min. Een groep controle muizen zal gedurende 2 uur op de loopband geplaatst worden zonder dat deze aan staat. Dit inspanningsprotocol geeft inzicht in de metabole veranderingen gedurende duurinspanning.

Maximaal protocol:

De muizen zullen eerst een warming-up doen van 15 min met een snelheid van 12 m/min. Na afloop van de warm-up wordt de snelheid per 1.5 minuten met 1 m/min en 1 hellingsgraad opgevoerd. Als de dieren ondanks diverse prikkels niets in staat zijn de loopbandsnelheid vast te houden omdat hun ledematen het opgeven wordt de band stopgezet. De prikkel bestaat uit het met de vinger aanrakken van de achterkant van de muis. Daarnaast wordt de muis geprikkeld wanneer hij de achterwand van de loopband toucheert, wat bestaat uit plexiglas waaraan de ruwe zijde van klittenband bevestigd is. De verwachting is dat de muizen na de warm-up na ongeveer 20-30 minuten hun maximum zullen bereiken. Een groep controle muizen zal gedurende een vergelijkbare tijd op de loopband geplaatst worden zonder dat deze aan staat. Uit het tijdstip van opgave kan de verrichte arbeid worden berekend. Dit inspanningsprotocol geeft informatie over het maximaal duurvermogen en geeft tevens inzicht in de metabole veranderingen gedurende maximale inspanning.

In het verleden zijn bovenstaande inspanningsprotocollen al met succes toegepast binnen onze onderzoeksgroep.

Bij beide inspanningsprotocollen wordt ook een controlegroep muizen meegenomen die geen inspanning doen maar wel op de stilstaande loopband geplaatst worden. Er ontstaan daardoor maximaal 4 groepen. Beide inspanningsprotocollen zullen worden uitgevoerd in muizen waarin een bepaald gen en/of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd, waarbij wildtype dieren als controlegroep fungeren. Een individuele dierproef bestaat dus uit maximaal 8 groepen.

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

B. De dieren

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) omdat een groot deel van de vrouwelijke muizen vaak wordt ingezet voor de fok van de muizen; b) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; c) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten. De specifieke muizenlijnen waarbij bepaalde genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd zullen op diverse manieren worden verkregen: 1) aankopen via commerciële dierenlabs, zoals Jackson labs of Harlan, 2) muizenlijn is al beschikbaar in dierfaciliteit, 3) verkregen via samenwerking

met een ander lab, 4) zelf vervaardigd (zie bijlage volgnummer 1).

Zoals hierboven aangegeven bestaat een individuele dierproef met inspanning op de loopband uit maximaal 8 groepen. Uitgaande van maximaal 12 muizen per groep komen we per individuele dierproef op maximaal 96 muizen. Binnen dit project willen we deze experimentele opzet maximaal 5 keer toepassen. De reden voor het lagere aantal ten opzichte van de andere onderdelen is dat niet voor alle genen en pathways die we willen onderzoeken er een effect op spier en inspanning verwacht wordt. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 480.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: De metabole veranderingen die optreden tijdens fysieke inspanning zijn een resultaat van de interactie tussen meerdere organen, waaronder het vetweefsel, de lever en de spieren. Deze interactie tussen verschillende organen kan helaas nog niet in-vitro worden nagebootst. Om een goed beeld te krijgen van de rol van een bepaald gen en/of signaalroute bij het energiemetabolisme tijdens fysieke inspanning is het werken met proefdieren dus noodzakelijk. De aanleiding om de genen en signaalroutes verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een mogelijke rol van het gen of de signaalroute in het energiemetabolisme suggereren. Wanneer een vraagstelling beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

Vermindering: de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Vermindering van het aantal proefdieren zal verder worden bereikt door de experimenten zo efficiënt mogelijk in te vullen, o.a. door hergebruik van controlegroepen (indien mogelijk).

Verfijning: Er zal geen gebruik worden gemaakt van de mogelijkheden die de loopband biedt om de muis tot rennen te dwingen door de muizen een kleine elektrische schok te geven op het moment dat ze van de loopband afglijden. In plaats daarvan zullen de muizen mbv. een vinger geprikkeld worden, alsmede door het toucheren van de muis van de achterwand van de loopband.

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

De muizen zullen eerst voorzichtig vertrouwd worden gemaakt met de loopband voordat het werkelijke inspanningsprotocol zal worden uitgevoerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Op het eind van de proef zal bloed afgenomen worden via orbitapunctie. Deze handeling zal onder isofluraan verdoving worden uitgevoerd. Om te garanderen dat de muizen volledig onder narcose zijn, zal in de gaten worden gehouden of de muizen reageren op prikkels van buitenaf.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het inspanningsprotocol zal ongerief veroorzaken maar de kans dat muizen pijn zullen lijden is klein. Het ontwerp van de loopband beperkt de kans dat de muizen zich op de één of andere manier zouden kunnen bezeren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief voor muizen blootgesteld aan één van beide inspanningsprotocollen is gesteld op matig. Fysieke inspanning is natuurlijk voor muizen. Afhankelijk van de stam kan de vrijwillig afgelegde loopafstand per dag variëren van enkele honderden meters tot 20 km.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van de proef worden de dieren opgeofferd om diverse weefsels te verzamelen. De aard van de primaire eindpunten (onder ander de expressie van diverse genen in spierweefsel) vereist dat de dieren worden opgeofferd. De weefsels die verzameld worden zullen worden gebruikt voor talloze aanvullende analyses: histologie, biochemische bepalingen, moleculaire analyses etc. Deze analyses zijn essentieel om de vraagstelling van de proef te kunnen beantwoorden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

7 september 2015

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD104002015236
2. Titel van het project: 'de rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme'
3. Titel van de NTS: 'de rol van bepaalde genen in het energiemetabolisme'
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
De nog te erkennen DEC-Wageningen-UR; Dit is een samenvoeging van DEC-DLO en DEC-WU.
[REDACTED]
Secretaris: [REDACTED]
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 05-08-2015
Aanvraag compleet: ja
In vergadering besproken: 18-08-2015
Anderszins behandeld: nee
Termijnonderbreking van 24-08-2015 tot 31-08-2015 en van 03-09-2015 tot 07-09-2015 (overzetten in format CCD)
Aanpassing aanvraag: 31-08-2015 en 07-09-2015
Advies aan CCD: 07-09-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 24-08-2015
Strekking van de vragen:
De DEC heeft vragen gesteld over:
 - Het projectplan:
 - Verheldering van de manier, waarop een van de benoemde mechanismes zal worden onderzocht;
 - Duidelijker afbakening/ definiëring van enkele gehanteerde begrippen (m.n. NAFLD);
 - Vertaalbaarheid van de resultaten, verkregen met mannelijke muizen, voor vrouwen in de humane situatie;
 - De bijlagen:
 - Aanvulling op de beschrijving bij H. (pijn en pijnbestrijding) en bij I. (Overige aantasting van het welzijn en maatregelen);
 - Toelichting op de (groeps)huisvesting (aantal dieren per kooi);
 - Toelichting op verfijning (duur van het vasten);
 - Argumentatie voor de keuze van de temperatuur bij koudeblootstelling en voor de keuze van de temperatuur, die als humaan eindpunt geldt;
 - Herkomst van de gelabelde cellen (al dan niet in dierproef/ met ongerief);
 - Een redactionele opmerking.
 - De niet-technische samenvatting:
 - Correcte vermelding van het maximale aantal te gebruiken dieren;
 - Toevoegen van een ontbrekende welzijnsaantasting.

Datum antwoorden: 31-08-2015

Strekking van de antwoorden:

De onderzoeker heeft de vragen van de DEC beantwoord en de aanvraag tot tevredenheid van de DEC dienovereenkomstig aangepast.

Op 07-09-2015 zijn de formulieren opnieuw ingediend in het format van de CCD.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en fundamenteel van aard is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstellingen.
3. Het substantiële belang van het project wordt door de DEC onderschreven. Het project richt zich op de rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme, de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme en op de rol van deze genen en signaalroutes bij de ontwikkeling van metabole stoornissen (zoals obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten). Het betreft een fundamenteel/ mechanistisch onderzoek met potentieel grote relevantie voor metabole ziekten.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project. Vrijwel alle experimentele technieken en handelingen die in de verschillende onderdelen van dit project zijn beschreven zijn al eerder uitgevoerd binnen de onderzoeksgroep. Er is inmiddels veel ervaring met deze (be)handelingen.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
Eén type dierproef is erop gericht om muizen te vervaardigen die in de overige proeven zullen worden (her)gebruikt. De dieren die worden gebruikt in de pilot om te onderzoeken of het virus inderdaad de gewenste activatie of inactivatie teweeg brengt zullen niet worden hergebruikt.
Er worden handelingen verricht, die (veelal kortdurend) pijn kunnen veroorzaken en waarbij geen pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden worden toegepast. Dit is voldoende beargumenteerd.
In sommige typen dierproef worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest (individueel). Dit is afdoende beargumenteerd.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal, afhankelijk van het type dierproef bestaan uit individuele huisvesting, bloedafnames, injecties, vasten, maximale fysieke inspanning, koudeblootstelling of lichte ontsteking.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De rol van een gen bij de metabole interactie tussen diverse organen zoals vetweefsel, de lever en de spieren, kan niet in vitro worden vastgesteld. Om een goed beeld te krijgen van de rol van een bepaald gen bij het energiemetabolisme (tijdens bijv. fysieke inspanning, vasten, koudeblootstelling) is het werken met proefdieren noodzakelijk. De keuze voor de te onderzoeken genen is veelal gebaseerd

- op in-vitro- studies die een mogelijke rol van het gen in het energiemetabolisme suggereren.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruikmakend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Daarnaast zullen de experimenten zo efficiënt mogelijk worden ingevuld o.a. door gebruik van één controlegroep voor meer proefgroepen (indien mogelijk).
 9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Om ongerief als gevolg van de individuele huisvesting te verminderen zal auditief en olfactorisch contact mogelijk worden gemaakt. Er zal gebruik worden gemaakt van kooiverrijking. De duur van het vasten zal zo kort mogelijk zijn. Van alle behandelingen wordt de duur en intensiteit zo gekozen dat het ongerief wordt geminimaliseerd. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
 10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken. Zij heeft hierbij speciale aandacht gevraagd voor het gebruik van een controlegroep met een eiwitvrij dieet.
 11. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

De DEC is unaniem van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dilemma: De DEC signaleert, dat het project zich richt op (het bestrijden van) welvaartsziekten, waarbij de ethische vraag gelegitimeerd is, of deze niet zonder het gebruik van proefdieren zijn te bestrijden ("minder eten, meer bewegen") en of je niet beter daar je energie op zou kunnen richten. Zij is echter ook van mening, dat metabool syndroom een belangrijke ziekte is en een groot, wereldwijd probleem vormt. Zij heeft het project binnen die context besproken en geconcludeerd dat het een bijdrage kan leveren aan het vergroten van de (fundamentele) kennis over het energiemetabolisme in relatie tot het immuunsysteem en de rol die dat speelt bij metabool syndroom. Hierbij tekent zij tevens aan, dat de problematiek rond het gebruik van proefdieren t.b.v. de bestrijding van welvaartsziekten (en verslaving) een keer in een breder perspectief aan de orde gesteld moet worden.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD104002015236

Bijlagen

2

Datum 8 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD104002015236. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10400

Naam instelling of organisatie: Wageningen-Universiteit

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 9215846

Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12

Postbus: 59

Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN

IBAN: NL10RABO0397066465

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 december 2015
Geplande einddatum: 30 november 2020
Titel project: De rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme
Titel niet-technische samenvatting: De rol van bepaalde genen in het energiemetabolisme
Naam DEC: DEC-WU
Postadres DEC: Postbus 9191 6700 HB Wageningen
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Wageningen
Datum: 7 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

[Redacted]
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB WAGENINGEN
[Barcode]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD104002015236
Bijlagen
2

Datum 8 september 2015
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 8 september 2015
Vervaldatum: 8 oktober 2015
Factuurnummer: 15700236
Ordernummer: WUR888369

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD104002015236	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

Van: DEC <dec@wur.nl>
Verzonden: maandag 5 oktober 2015 16:36
Aan: Info-zbo
Onderwerp: RE: vraag betreffend advies AVD104002015236

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste mevrouw [REDACTED]

Het lijkt er inderdaad op, dat er sprake is van verwarring met een ander projectvoorstel. Er wordt geen eiwitvrije controlegroep gebruikt in onderhavig project. Excuus voor deze vergissing.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Secretaris DEC WUR

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: maandag 5 oktober 2015 16:28
Aan: DEC
Onderwerp: vraag betreffend advies AVD104002015236

Geachte secretaris van DEC WUR,

Bij de behandeling van projectaanvraag AVD104002015236 getiteld: "de rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme" waarover uw DEC advies aan de CCD heeft uitgebracht, hebben wij nog een vraag aan u. Op het formulier bij punt C (beoordeling) punt 10. Refereert u aan het oordeel van de IvD waarin speciaal aandacht wordt gevraagd voor het gebruik van een controle groep met eiwitvrij dieet.

Voor zover wij hebben kunnen nagaan wordt in geen van de bijlages dierproeven eiwitvrij dieet gebruikt. Kunt u dit nader toelichten, of is hier sprake van een verwarring met een ander projectvoorstel?

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl<mailto:info@zbo-ccd.nl> (let op: nieuw emailadres!)



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD104002015236

Uw referentie

14 OKT. 2015

Datum:

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte [REDACTED]

Op 7 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme" met aanvraagnummer AVD104002015236. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De tweede voorwaarde is een algemene voorwaarde die wordt gesteld aan langjarige projecten om te voldoen aan datgene wat voortvloeit uit artikel 10 van de wet. U kunt met uw project "De rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 december 2015 tot en met 30 november 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-WU gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 5 oktober 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. In het DEC advies wordt gerefereerd aan een eiwit vrij dieet. De DEC heeft bij navraag bevestigd dat dit om een verschrijving gaat. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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

Bezwaar

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

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

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

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

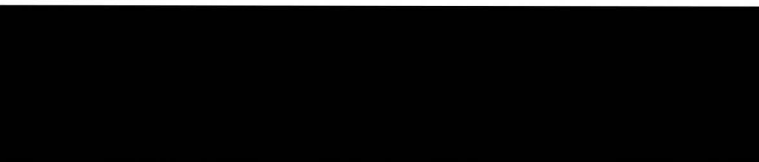
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Wageningen Universiteit
Adres: Postbus 59
Postcode en woonplaats: 6700AB Wageningen
Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 december 2015 tot en met 30 november 2020 voor het project "De rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme" met aanvraagnummer AVD104002015236, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-WU.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 7 september 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 september 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 september 2015;
 - c. Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 september 2015, ontvangen op 7 september 2015;

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Vervaardiging van muizen waarin een bepaald gen of signaalroute geactiveerd of geïnactiveerd is met behulp van adeno-associated virus	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / wild type	100	Licht / mild
Hoogvetdieet als stressor voor ophelderen functie van genen	Muizen (<i>Mus musculus</i>) wild type + genetisch gemodificeerd	960	Matig / moderate
Vasten als stressor voor ophelderen functie Van genen	Muizen (<i>Mus musculus</i>) wild type of genetisch gemodificeerd	720	Matig / moderate
Koude blootstelling als stressor voor ophelderen functie van genen	Muizen (<i>Mus musculus</i>) wild type of genetisch gemodificeerd	768	Matig / moderate
Activatie van het immuunsysteem als stressor voor ophelderen functie van genen en pathways	Muizen (<i>Mus musculus</i>) wild type of genetisch gemodificeerd	768	Matig / moderate
Fysieke inspanning als stressor voor ophelderen functie genen	Muizen (<i>Mus musculus</i>) wild type of genetisch gemodificeerd	480	Matig / moderate

Datum
14 oktober 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD104002015236

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen met instemming van de IvD.

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

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

Datum
14 oktober 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD104002015236

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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



Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 14 oktober 2015 12:57
Aan: [Redacted] |
CC: [Redacted]
Onderwerp: Beschikking AVD104002015236
Bijlagen: Beschikking 236.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze beschikking is ook per post verstuurd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....