

	Inventaris Wob-verzoek W16-10S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015284								
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x		



20 OKT. 2015

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?	Ja > Vul uw deelnemernummer in	10700	1284
		Nee > U kunt geen aanvraag doen		
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	
		KvK-nummer	50169181	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	[Redacted]	
		Postbus	Postbus 616	
		Postcode en plaats	[Redacted]	Maastricht
		IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	Dhr.
		Functie	[Redacted]	
		Afdeling	[Redacted]	
		Telefoonnummer	[Redacted]	
		E-mailadres	[Redacted]	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	Dhr.
		Functie	[Redacted]	
		Afdeling	[Redacted]	
		Telefoonnummer	[Redacted]	
		E-mailadres	[Redacted]	

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

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?	Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
	Nee > Ga verder met vraag 3
2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	Nee > Ga verder met vraag 3
	Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 10 - 2015
	Einddatum	31 - 08 - 2018
3.2 Wat is de titel van het project?	De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten.	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Nieuwe inzichten in het ontstaan van levertoxiciteit.	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC-UM
	Postadres	Postbus 616/box 48/6200 MD Maastricht
	E-mailadres	Secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

4 Betaalgegevens

4. Om welk type aanvraag gaat het?	Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00	Lege
1	Wijziging €	Lege
4. Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.		
2	Na ontvangst van de factuur. Graag budgetnummer (30943314N) vermelden op factuur	
<i>Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.</i>		

5 Checklist bijlagen

5. Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
1	X Projectvoorstel
	X Niet-technische samenvatting
	Overige bijlagen, indien van toepassing
	Melding Machtiging

6 Ondertekening

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

Naam	
Functie	
Plaats	Maastricht
Datum	08-10-2015
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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Dagelijks worden wij blootgesteld aan omgevingsfactoren die genotoxische effecten kunnen veroorzaken (bv industriële uitlaatgassen, pesticide, drugs, tabak). Ons lichaam heeft verschillende mechanismen tot zijn beschikking om de ontstane schade te herstellen zoals verschillende DNA reparatie mechanismen en antioxidant reacties (Iyama, T, 2009; Keum, Y.-S., 2012). Het onsuccesvol herstel van schade kan bijdragen aan een toxicologische of carcinogene reactie. Dergelijke schade herstel mechanismen zijn in grote mate afhankelijk van veranderingen in genexpressie op RNA niveau. Wij en andere hebben deze veranderingen (de transcriptoom) in kaart gebracht na de blootstelling aan een groot panel van (geno)toxische stoffen in verschillende cel types. Deze kennis heeft het mogelijk gemaakt dat wij (geno)toxische stress op basis van genexpressie kunnen classificeren en voorspellen. Voor een succesvol schade herstel is een verandering op RNA niveau alleen vaak niet voldoende. Het RNA zal moeten worden omgezet in eiwit voordat er een fenotypische verandering optreedt en er herstel kan plaatsvinden. Dit proces, genaamd mRNA translatie, is een zeer dynamisch proces dat tijdens een stressreactie snel kan veranderen. Tot op heden is dit aspect van regulatie na genotoxische stress nagenoeg niet onderzocht. Dit is opvallend omdat het belang van dit mechanisme bij andere types van stress zoals hypoxie, bestraling en oncogene activatie zeer duidelijk is aangetoond (Leprivier, Rotblat, Khan, Jan, & Sorensen, 2015; Fähring, 2009). Wij voorzien dat het bestuderen van mRNA translatie tijdens genotoxische blootstelling zal leiden tot een verbeterd en completer beeld van de reactie die volgt op genotoxische stress.

De regulatie van mRNA translatie vindt voornamelijk plaats tijdens de initiatie stap van dit proces. Er zijn twee signaleringsroutes die de translatie van mRNA reguleren. De 'mammalian Target of Rapamycin complex 1' (mTORC1) pathway stimuleert mRNA translatie en eiwit synthese doormiddel van de fosforylatie van 'eukaryotic initiation factor 4^E binding protein' (4E-BP1), S6 kinase 1 (S6K) en 'eukaryotic elongatie factor 2 kinase' (EEF2K). Verschillende stress signalen remmen de activiteit mTORC1 en dit heeft een grote invloed op de getranslateerde mRNAs (Ma & Blenis, 2009). Translatie wordt ook gereguleerd door de 'unfolded protein response' (UPR), activatie van deze response leidt tot een globale remming van mRNA translatie zodat de opeenstapeling van onvolledig of foutief gevouwen eiwitten stopt. Tegelijkertijd word de translatie van genen die belangrijk zijn voor de stressreactie zoals ATF4 juist gestimuleerd (Walter & Ron, 2011). Tijdens dit project willen wij voor ieder gen in ons lichaam meten hoe goed dit wordt omgezet in eiwit. Met andere woorden willen we meten hoe efficiënt mRNA translatie verloopt voor ieder gen en hoe dit verandert tijdens genotoxische stress. Tevens willen wij bepalen welke groepen van genen gereguleerd worden door de mTORC1 signaaltransductie route en welke door de UPR.

Op dit moment zijn toxicologische studies afhankelijk van dierexperimenten. De 'rodent bioassay' wordt gezien als de gouden standaard voor het bepalen van de toxiciteit van nieuwe stoffen. Om carcinogeniteit vast te stellen worden muizen of ratten gedurende 2 jaar dagelijks blootgesteld aan een zeer hoge dosis van een desbetreffende stof. Deze dierproeven kunnen verminderd en in de toekomst vervangen worden. Daarvoor willen wij *in vitro* laboratorium assay ontwikkelingen voor het bepalen van de toxicologische uitkomst (Kleinjans, 2014). Om de transitie naar *in vitro* modellen mogelijk te maken is het cruciaal dat wij een gedetailleerd en compleet overzicht hebben van de mechanismen die ten grondslag liggen aan deze *in vitro* testen. Hiervoor is verder mechanistisch onderzoek noodzakelijk. Met deze studie willen wij meer inzicht verkrijgen in het belang van mRNA translatie tijdens genotoxische stress.

Daarnaast kunnen wij aan de hand van deze datasets nieuwe biomarkers ontdekken die gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van nieuwe *in vitro* toxiciteitstesten. Voor dit onderzoek gaan wij primaire muis hepatocyten gebruiken die geïsoleerd worden van de muis doormiddel van een twee stap collagenase perfusie. Wij hebben heeft veel ervaring met deze techniek (Mathijs, Brauers, et al., 2009; Mathijs, Kienhuis, et al., 2009; Van den Hof et al., 2014).

Referenties

- Fähling, M. (2009). Surviving hypoxia by modulation of mRNA translation rate. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9a), 2770-2779. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00875.x
- Iyama, T, Wilson III, D. M., (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells, *DNA Repair*, 12(8), August 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>.
- Keum, Y.-S. (2012). Regulation of Nrf2-Mediated Phase II Detoxification and Anti-oxidant Genes. *Biomolecules & Therapeutics*, 20(2), 144–151. doi:10.4062/biomolther.2012.20.2.144
- Kleinjans, J. (2014). Chapter 1.1 - Introduction to Toxicogenomics-Based Cellular Models. In J. Kleinjans (Ed.), *Toxicogenomics-Based Cellular Models* (pp. 3-11). San Diego: Academic Press.
- Leprivier, G., Rotblat, B., Khan, D., Jan, E., & Sorensen, P. H. (2015). Stress-mediated translational control in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 845-860. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.11.002
- Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5), 307-318. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2672>
- Mathijs, K., Brauers, K. J. J., Jennen, D. G. J., Boorsma, A., van Herwijnen, M. H. M., Gottschalk, R. W. H., . . . van Delft, J. H. M. (2009). Discrimination for Genotoxic and Nongenotoxic Carcinogens by Gene Expression Profiling in Primary Mouse Hepatocytes Improves with Exposure Time. *Toxicological Sciences*, 112(2), 374-384. doi:10.1093/toxsci/kfp229
- Mathijs, K., Kienhuis, A. S., Brauers, K. J. J., Jennen, D. G. J., Lahoz, A., Kleinjans, J. C. S., & van Delft, J. H. M. (2009). Assessing the Metabolic Competence of Sandwich-Cultured Mouse Primary Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(6), 1305-1311. doi:10.1124/dmd.108.025775
- Van den Hof, W. F. P. M., Coonen, M. L. J., van Herwijnen, M., Brauers, K., Wodzig, W. K. W. H., van Delft, J. H. M., & Kleinjans, J. C. S. (2014). Classification of Hepatotoxicants Using HepG2 Cells: A Proof of Principle Study. *Chemical Research in Toxicology*, 27(3), 433-442. doi:10.1021/tx4004165
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086. doi:10.1126/science.1209038

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit onderzoek is het bepalen van de impact van genotoxische stress op de regulatie van mRNA translatie doormiddel van het gebruik van primaire muis hepatocyten.

De doelstelling van deze studie zijn:

1. Het genereren van een totaal RNA expressie profielen met behulp van 'RNA sequencing' (RNAseq) van de primaire muis hepatocyten na de blootstelling van genotoxische stoffen.
2. Het generen van polysomaal RNA expressie profielen net als in 1.
3. Het berekenen van translatie-efficiëntie tijdens genotoxische stress van alle genen met behulp van RNAseq data van 1 en 2
4. Identificeren en valideren van nieuwe biomarkers die gerelateerd zijn aan de genotoxische stress.
5. Bepalen van de rol van de pathways die mRNA translatie reguleren tijdens genotoxische stress.

Onze hypothese is dat de mogelijkheid om mRNA translatie te reguleren van belang is voor een cel om tijdens genotoxische stress adequaat te reageren en zodoende opgedane schade te minimaliseren en herstellen. Om deze hypothese te testen gaan wij primaire muis hepatocyten blootstellen aan verschillende genotoxische stoffen om vervolgens m.b.v. RNAseq te bepalen welke mRNAs verschillend tot expressie komen en welke mRNAs verschillend getransleerd worden. Om dit mogelijk te maken scheiden wij eerst alle mRNAs op basis van de mate waarin ieder mRNA getransleerd wordt m.b.v. sucrose gradiënten. Dit levert ons verschillende fracties van mRNA op, variërend van niet getransleerd tot zeer goed getransleerd. Deze fracties zullen wij vervolgens analyseren m.b.v. RNAseq. Dit stelt ons in staat om te bepalen met welke snelheid een mRNA wordt omgezet in eiwit tijdens controle condities en tijdens genotoxische stress. Deze data zal ons nieuwe inzichten geven in transcriptionele en translationele veranderingen die plaatsvinden tijdens genotoxische blootstellingen. Verder kunnen we deze data gebruiken om andere datasets (transcriptoom en proteoom) met elkaar te koppelen in inzichtelijke patronen om zo de mechanismen die ten grondslag liggen aan de genotoxische reactie beter in kaart te kunnen brengen.

3.3 Belang

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

Verbeterd inzicht in de mechanismen die leiden tot toxiciteit is cruciaal voor het ontwikkelen van *in vitro* toxiciteit testen. Deze *in vitro* testen zijn hoog noodzakelijk om een goed alternatief te bieden voor de standaard dier testen die gebruikt worden voor toxiciteitstesten. Om tot nieuwe inzichten te komen hebben in het verleden verschillende studies plaatsgevonden die erop gericht waren om veranderingen in totaal RNA expressie en/of eiwit expressie te meten. Beide benaderingen hebben hun eigen beperkingen met als gevolg dat het integreren en vervolgens begrijpen van deze twee datasets lastig kan zijn. Door het bestuderen van mRNA translatie willen wij de integratie van totaal RNA en eiwit expressie verbeteren. Met deze verbeterde inzichten kunnen wij belangrijke mechanismen identificeren die de oorzaak zijn van het ontstaan en het aanhouden van genotoxische stress. Tevens zal deze nieuwe kennis kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe *in vitro* genotoxische testen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Fase 1

Het onderzoeken of de blootstelling van benzo(a)pyrene leidt tot verandering van de mRNA translatie in muis hepatocyten. Gen expressie wordt gemeten van totaal RNA monsters en polysome fracties. Wanneer de translatie van genen na de behandeling van benzo(a)pyrene verandert ten opzicht van de controle monsters en als gen expressie van de verschillende biologische replica's van de polysome assay vergelijkbaar zijn met de totale RNA expressie gaan we verder met het project. Dit is het eerste 'go, no go' punt.

Fase 2

Het valideren van de data uit fase 1. Deze validatie bestaat uit het meten van de getransleerde genen d.m.v. qPCR en eiwit expressie van nieuw gesynthetiseerde eiwitten d.m.v. Western blotting. Hiervoor zijn nieuwe muis hepatocyten nodig omdat al het polysomaal RNA van fase 1 gebruikt wordt voor RNAseq en er nog geen eiwitmonsters zijn. Wanneer er een correlatie is met de data van fase 1 gaan we verder met het project. Dit is het tweede 'go, no go' punt.

Fase 3

Deze fase komt overeen met fase 1 en 2 alleen het experiment wordt uitgebreid met 4 andere genotoxische stoffen en meerdere tijdspunten.

Fase 4

Tijdens deze fase wordt het belang van de regulatoire mechanismen (mTOR en UPR) van translatie tijdens genotoxische stress bepaald. Doormiddel van het analyseren van de genexpressie (fase 1&3) en het uitschakelen van de mechanismen door middel van shRNA lentivirale infecties.

Wij hebben al veel ervaring met het isoleren en kweken van primaire muis hepatocyten dat wij geen problemen verwachten.

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

Dit project bestaat uit vier delen, voor elk deel is de isolatie van muis hepatocyten nodig.

1. RNAseq van polysome fracties
2. Validatie of RNAseq resultaten
3. Uitbreiden van 1+2 met andere genotoxins en tijd punten
4. De rol van mTORC1 en UPR bepalen tijdens genotoxische stress

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.

Fase 1: In deze fase onderzoeken wij of de translatie van mRNA verandert na de blootstelling van een genotoxine en hoe robuust de combinatie van de polysome assay en RNAseq is. In deze fase is het belangrijk dat wij een verandering van de translatie van mRNA kunnen detecteren en kunnen koppelen aan biologische mechanismen. Wanneer wij dit kunnen aantonen gaan wij naar fase 2.

Fase 2: Het valideren van de gevonden resultaten van fase 1 is een belangrijk onderdeel van het onderzoek om de betrouwbaarheid van de RNAseq data vast te stellen. Wanneer RNAseq data overeen komt met de validatie experimenten gaan wij verder met onderzoek.

Fase 3: Wij verwachten dat genotoxische stress via verschillende mechanismen kan worden aangezet daardoor is het belangrijk dat wij onze experimenten uitbreiden met meerdere genotoxins. Zodat wij zo veel mogelijk verschillende biologische pathways kunnen identificeren die belangrijk zijn voor de ontwikkeling en het aanhouden van genotoxische stress.

Fase 4: mTORC1 en UPR zijn de belangrijkste mechanismen die translatie reguleren. Hier gaan we met eenzelfde aanpak RNAseq data genereren na het uitschakelen van mTORC1 en UPR signalering. Hiermee kunnen wij genen identificeren die door beide signaaltransductie routes gereguleerd worden en bepalen wat hun belang is tijdens genotoxische stress.

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

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



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10700	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Maastricht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
			Hepatocyten isolatie

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.

Regulatie van mRNA translatie is een belangrijk mechanisme dat de cel in staat stelt om snel te reageren op stressvolle condities. Onderzoek heeft uitgewezen dat dit belangrijk is tijdens zuurstof tekort, bestraling en oncogen activatie. Er is echter nagenoeg niets bekend over het belang van mRNA translatie tijdens de response voor genotoxische blootstellingen. Met dit onderzoek willen wij genen ontdekken waarvan de mRNA translatie veranderd in reactie op genotoxines.

Dit toxicologisch onderzoek focust zich op de lever aangezien dit de belangrijkste plaats in het lichaam is waar biotransformatie en detoxificatie van lichaamsvreemde elementen plaatsvindt. In dit onderzoek zullen we vers geïsoleerde primaire muizen hepatocyten verder kweken in collageen sandwich culturen in ons laboratorium. Na blootstelling aan genotoxische stoffen zullen totaal RNA en polysomaal RNA (effectief getransleerd RNA) geïsoleerd worden. Vervolgens bepalen we doormiddel van RNAseq de expressie profielen van beide RNA fracties. Aan de hand van deze data berekenen we vervolgens de translatie efficiëntie. Voor de validatie experimenten zal naast RNA en polysomaal RNA ook totaal eiwit geïsoleerd worden. De eiwit samples worden in ons

laboratorium geanalyseerd worden doormiddel van Western blotting voor de kandidaat genen.

Deze studies zullen leiden tot:

1. Expressieprofielen van totaal RNA met behulp van RNAseq voor alle genen in muizen hepatocyten onder controle condities en na blootstelling aan genotoxische stoffen.
2. Expressieprofielen van getransleerd (polysomaal) RNA met behulp van RNAseq voor alle genen in muizen hepatocyten als in 1.
3. Translatie efficiëntie waardes voor alle genen bepaald aan de hand van dataset verkregen in 1 en 2 in muizen hepatocyten als in 1 en 2.
4. Validatie van top kandidaten op RNA en eiwit niveau.
5. Inzichten in de pathways die mRNA translatie beïnvloeden tijdens genotoxische stress.

Kandidaat genen die we in deze studie identificeren dienen als potentiële biomarkers die gebruikt kunnen worden voor het ontwikkelen van nieuwe in vitro testen voor het bepalen van genotoxiciteit en carcinogeniteit. Het ultieme doel is een bijdrage te leveren aan het verminderen van het aantal proefdier studies voor het bepalen van carcinogeniteit.

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 muis wordt onder anesthesie gebracht om vervolgens hepatocyten te isoleren doormiddel van een twee-stap collagenase perfusie. Deze procedure met de muis duurt ongeveer 1 uur en eindigt met het euthanaseren van de muis.

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

Met behulp van een power berekening hebben wij aangetoond hoeveel biologische replica's van de primaire hepatocyten culture wij nodig hebben. Omdat wij geen verschillende muizen groepen hebben maar RNAseq samples van de primaire muis hepatocyten wordt statistiek toegepast voor deze samples. RNAseq is een procedure met veel verschillende stappen waardoor deze techniek veel verschillende variabelen heeft zoals de kwaliteit van de library en het aantal reads per sample. Door het gebruik van gefokt dieren van hetzelfde geslacht is de biologische variaties tussen de samples het laagst en zijn er uiteindelijk minder dieren nodig. Voor de power berekening van RNAseq samples hebben wij de Package RNASeqPower versie 1.9.0 gebruikt (Therneau T, Hart S and Kocher J).

Referentie power berekening: Therneau T, Hart S and Kocher J. Calculating samples size estimates for RNA Seq studies. R package version

B. De dieren

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

Voor onze experimenten gebruiken wij mannelijke C57BL/6 muizen met een herkomst van een geregistreerd fok bedrijf. Hierbij zullen wij zoveel mogelijk gebruik maken van surplus dieren. De C57BL/6 muizen worden standaard gebruikt voor farmacologische en toxicologische onderzoeken. Wij hebben in het verleden een grote hoeveelheid data gegenereerd met hepatocyten van mannelijke muizen van deze soort. De huidige studie is erop toegespitst om naast het verschaffen van nieuwe data ook de oude datasets te verrijken. Het is dus cruciaal dat we deze experimenten met precies dezelfde muizen (mannelijke C57BL/6) en condities uitvoeren. Daarnaast willen wij zo min mogelijk variatie introduceren in onze experimenten door met één geslacht te werken, de mannelijke muizen. Hoe lager de variatie des te minder muizen we nodig hebben. Het aantal muizen dat we nodig hebben hangt af van het aantal geïsoleerde levende hepatocyten per lever. Voor de polysome assay gaan wij 5 miljoen hepatocyten per monster gebruiken (dit is inclusief totaal RNA fractie voor RNA seq). Uit onze eigen studies hebben wij berekend dat wij per lever 2,5 culturen kunnen starten. Voor ieder genotoxine behandelen wij de cellen op twee tijdstippen en met twee concentraties. Dit resulteert in 5 culturen per genotoxine (inclusief onbehandelde controles). In totaal gaan wij 5 genotoxins testen

en hebben wij deze cultures 9x nodig (biologische replica's voor het sequensen (5x), validatie (2x), en mTORC1 en UPR studies (2x)). Wij verwachten dat er 10% extra cultures nodig zijn voor eventuele uitval en door de opbrengst van levende hepatocyten per lever varieert. In totaal zijn er 250 cultures nodig en dit zijn 100 muizen.

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.

Voor de vervanging van het dieren experiment hebben we overwogen om humane hepatocyten te isoleren. Echter is het niet ethisch verantwoord om leverweefsel van gezonde vrijwilligers te vragen. Het verkrijgen van humaan leverweefsel via het ziekenhuis kan sporadisch. Het grote probleem met deze leverweefsels is echter dat ze afkomstig zijn van patiënten met leveraandoeningen zoals leverkanker of steatose. Vaak zijn deze weefsels al blootgesteld zijn aan medicijnen zoals chemotherapie. Voor ons onderzoek is het echter zeer belangrijk om 'gezonde' hepatocyten te gebruiken waardoor deze potentiële bron van hepatocyten afvalt. Van kanker cellijnen of geïmmortaliseerde levercellijnen komt het fenotype niet meer overeen met primaire hepatocyten en hebben een verlaagde expressie van de metabolische fase I en II enzymen. Deze enzymen zijn nodig voor het omzetten van stoffen en zijn dus cruciaal voor het bestuderen van toxiciteit (Soldatow et al., 2013; Gerets et al., 2012). Omdat de hepatocyten snel dood gaan tijdens zuurstof tekort is het niet mogelijk om levende hepatocyten te isoleren van dode dieren. Voor het onderzoek zijn levende hepatocyten nodig waardoor wij geen slachthuismateriaal kunnen gebruiken.

In het kader van vermindering zullen wij onze blootstellingen in vitro uitvoeren i.p.v. in vivo. Dit betekent dat we 2,5 blootstellingen kunnen uitvoeren per muis i.p.v. één. Verder kunnen we het aantal muizen verminderen door de biologische variatie zo laag mogelijk te houden. We weten van analyses uit het verleden dat het gebruik van alleen het mannelijke geslacht een sterk verminderde variatie optreedt dan wanneer mannetjes en vrouwtje gebruikt worden. Bovendien wordt er gebruik gemaakt van historische controles. Als er binnen het fokprogramma van de universiteit een surplus aan mannelijke C57BL/6 muizen is zullen wij deze muizen eerst gebruiken.

Voor de verfijning van het experiment worden de dieren in slaap gebracht. Verder worden de dieren zelf niet aan genotoxische stoffen blootgesteld. Het potentieel ongerief veroorzaakt door de blootstelling wordt vermeden.

Referenties

Gerets, H. H. J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin, B. O., Dhalluin, S., & Atienzar, F. A. (2012). Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology*, 28(2), 69–87. <http://doi.org/10.1007/s10565-011-9208-4>

Soldatow, V. Y., LeCluyse, E. L., Griffith, L. G., & Rusyn, I. (2013). In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicology Research*, 2(1), 23–39. <http://doi.org/10.1039/C2TX20051A>

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.

Doordat de muizen onrustig worden door het transport naar een ander laboratorium worden de dieren onder anesthesie gebracht en de hepatocyten geïsoleerd op het dierenlaboratorium.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Het bestuderen van de effecten van genotoxische stoffen op mRNA translatie in hepatocyten is nog niet eerder uitgevoerd. Dit zijn wij op 2 manieren nagegaan. 1. Grondige zoekacties op pubmed omtrend dit onderwerp leveren geen studies op waarbij het effect van genotoxische stoffen op mRNA translatie is gemeten. 2. Binnen ons uitgebreid netwerk van nationale en internationale collaborators heeft niemand een dergelijke studie uitgevoerd.

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.

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.

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.

Terminaal

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Omdat wij voor deze studie alleen de hepatocyten nodig hebben en dat voor de isolatie van de cellen de lever wordt verwijderd.

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

DEC-advies

Projectvoorstel 2015-007-25-09-2015

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2015-007
2. Titel van het project: *De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten.*
3. Titel van de NTS: *Nieuwe inzichten in het ontstaan van levertoxiciteit.*
4. Type aanvraag:
 - ☒ X nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC/ DEC-UM
 - telefoonnummer contactpersoon/ [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon:
[REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - X ontvangen door DEC/ 18-9-2015
 - X aanvraag compleet/ 02-10-2015
 - X in vergadering besproken 25-09-2015
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking van 29-09-2015 tot 02-10-2015
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag
 - ☐ advies aan CCD
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden

- Aanwezige (namens) aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen
- Strekking van het (de) antwoord(en)

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum dd. 29-09-2015
- Strekking van de vragen:
 - De DEC-UM vraagt zich af of het niet mogelijk is om slachthuismateriaal te gebruiken of surplus dieren?
 - Hoe wordt de dood tot stand gebracht?

- Datum antwoord 02-10-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en); *De vragen zijn naar tevredenheid van de DEC-UM beantwoord.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag; **JA**

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
3. De DEC is competent om hierover te adviseren **JA**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering **NVT**

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- ☒ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
- ☐ uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- ☐ uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
- ☐ wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en) **JA**

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Het belang van de doelstelling wordt door de DEC-UM erkend, te weten: *men bestudeert mechanismen die leiden tot toxische schade, genotoxische stress, en mechanismen die de ontstane schade teniet trachten te doen. Beter inzicht in deze processen kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe in vitro genotoxische testen.*

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project **JA**, te weten: *Naar de overtuiging van de DEC-UM beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.*

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd

- ☐ Bedreigde diersoort (en) (10.e.4)
- ☐ Niet-menselijke primaten (10.e)
- ☐ Dieren in/uit het wild (10.f)
- ☒ Gefokt voor dierproeven (11)
- ☐ Zwerfdieren (10.h)
- ☐ Hergebruik (1.e.2)
- ☐ Huisvesting en verzorging
- ☐ Locatie: instelling vergunninghouder (10.g)
- ☒ Toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- ☒ Dodingsmethode (13.c.3)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het betreft een **terminaal experiment**.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen: Nee**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **JA**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **JA**
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd: **JA**

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren (niet), de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt (niet) gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project (geen) voordelen opleveren voor mens, dier of milieu.

D. Ethische afweging

De DEC-UM stelt enerzijds vast dat het project "De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten niet zonder dierproeven kan worden uitgevoerd". Het voorstel behelst het gebruik van mannelijke muizen in een terminale proef. Anderzijds onderschrijft de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier.

De DEC-UM acht de doelstelling van dit fundamentele onderzoek van substantieel belang. In het betreffende project bestudeert men mechanismen die leiden tot toxische schade, genotoxische stress, en mechanismen die de ontstane schade teniet trachten te doen. Beter inzicht in deze processen kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe in vitro genotoxische testen. Dit zal bijdragen aan de vermindering en vervanging van dierexperimenten in de toxicologie. Dit is van belang voor proefdieren en in het licht van het algemene streven naar het vervangen van dierproeven door alternatieve, diervriendelijke wetenschappelijke onderzoeksmethoden.

De opzet van het onderzoek sluit aan bij de doelstelling en is voldoende innovatief.

De aanvrager heeft de benodigde wetenschappelijke kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

De gewenste uitkomsten lijken relevant en haalbaar.

In de gekozen strategie, technieken en diermodel wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef zou kunnen worden vermeden. De DEC-UM onderschrijft de keuze voor uitsluitend mannelijke C57BL/6 muizen, waardoor de gegenereerde data ook met historische data vergeleken kunnen worden en de vermindering van aantallen wordt gediend.

Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM in haar ethische afweging het belang van de voorgestelde dierproeven in het project "De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten", van zwaarder gewicht dan de voorziene schade (terminaal ongerief en dood) voor de maximaal 100 betrokken dieren.

De DEC-UM beschouwt de voorgestelde dierproeven derhalve als ethisch gerechtvaardigd en voorziet het project "De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten van een positief advies".

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-UM tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toelaatbaar is.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

[Redacted]

Postbus Postbus 616

6200bMD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002015284

Bijlagen

2

Datum 19 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002015284. 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: 10700
Naam instelling of organisatie: Universiteit Maastricht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 50169181
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postbus: Postbus 616
Postcode en plaats: 6200bMD MAASTRICHT
IBAN: NL04 INGB 0679 5101 68
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Maastricht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

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 oktober 2015
Geplande einddatum: 31 augustus 2018
Titel project: De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten.
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe inzichten in het ontstaan van levertoxiciteit
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616/box 48/6200 MD Maastricht
E-mailadres DEC: Secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED] UM
Plaats: Maastricht
Datum: 8 oktober 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus Postbus 616

6200bMD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD107002015284

Bijlagen

2

Datum 19 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 oktober 2015

Vervaldatum: 18 november 2015

Factuurnummer: 15700284

Ordernummer: 30943314N

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002015284	€ 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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616
6200 MD Maastricht

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
AVD107002015284

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 25 november 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 19 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten' met aanvraagnummer AVD107002015284. 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.

U kunt met uw project 'De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten' starten. De vergunning wordt afgegeven van 25 november 2015 tot en met 31 augustus 2018.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM meegestuurd. De DEC heeft uw aanvraag besproken in haar vergadering van 25 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Op onderstaande punten wijken wij af van het DEC advies.

1) U heeft in uw aanvraag aangegeven alleen mannelijke dieren te willen gebruiken voor dit project. Uw overwegingen voor het alleen gebruik van mannelijke dieren heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. U heeft aangegeven dat u in het verleden een grote hoeveelheid data gegenereerd heeft met hepatocyten van mannelijke muizen. Aangezien de huidige studie erop is gericht om naast het verschaffen van nieuwe data ook de oude datasets te verrijken, is het volgens u cruciaal dat deze experimenten met precies dezelfde muizen en onder dezelfde condities uitgevoerd worden. U heeft aangegeven dat uit analyses in het verleden is gebleken dat door het gebruik van alleen het mannelijke geslacht een sterk verminderde variatie optreedt in vergelijking met het gebruik van zowel mannetjes als vrouwtjes. U stelt bovendien, in antwoord op een vraag van de DEC, daar waar mogelijk gebruik te maken van surplus dieren binnen het fokprogramma binnen de universiteit.

Wij hebben er geen bezwaar tegen dat u alleen mannelijke dieren gebruikt voor dit project indien u inderdaad gebruik zult maken van surplus dieren. Om dit te borgen, en om het aantal in

voorraad gedode dieren te beperken, hebben wij een aanvullende voorwaarde toegevoegd aan de vergunning.

2) In uw aanvraag geeft u aan uit welke fases uw onderzoek bestaat. Hoewel u in uw aanvraag verschillende keuzemomenten beschrijft, zijn wij van mening dat de criteria op basis waarvan u zult besluiten het onderzoek te continueren en met een volgende fase te starten niet in voldoende mate zijn beschreven. U dient daarom deze criteria voor aanvang van het project af te stemmen met de IvD. Deze voorwaarde is toegevoegd om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

In aanvulling op het DEC advies hebben wij een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

Wij nemen voor het overige het 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 liggen ten grondslag aan 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 het colofon.

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

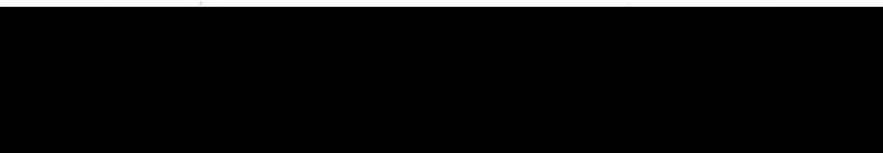
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.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:



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: Universiteit Maastricht
Postbus: Postbus 616
Postcode en woonplaats: 6200 MD Maastricht
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 25 november 2015 tot en met 31 augustus 2018, voor het project 'De rol van de regulatie van mRNA translatie tijdens genotoxische stress in primaire muis hepatocyten' met aanvraagnummer AVD107002015284, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies, omdat de CCD van mening is dat de criteria op basis waarvan besloten wordt het onderzoek te continueren en te starten met een nieuwe fase niet voldoende zijn beschreven. Daarnaast heeft de CCD een voorwaarde opgenomen waarmee het gebruik van surplus dieren geborgd wordt. In aanvulling op het DEC advies is een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 19 oktober 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 oktober 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 oktober 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 oktober 2015;

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Hepatocyten isolatie	Muizen (C57BL/6)	100	Terminaal

Voorwaarden

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

- 1) Het gebruik van alleen mannelijke dieren voor dit project wordt toegestaan op voorwaarde dat gebruik wordt gemaakt van surplus dieren.
- 2) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele keuzemomenten, inclusief de criteria op basis waarvan wordt besloten het onderzoek te continueren en te starten met een volgende fase, voor aanvang van het project ter goedkeuring worden voorgelegd aan de IVD.

Algemene voorwaarde

1) 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

Datum

25 november 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002015284

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 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.

Datum

25 november 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002015284

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.