

	Inventaris Wob-verzoek W16-12S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015355								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies			x					
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	
11	Mail beschikking 1-2-2016				x		x	x	

21 DEC 2015

AVD 108002015355



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>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de Instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Universiteit Utrecht</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>3 0 2 7 5 9 2 4</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	3 0 2 7 5 9 2 4									
Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	3 0 2 7 5 9 2 4																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">Straat en huisnummer</td> <td>Instatie voor Dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>12007</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>3501AA Utrecht</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL27INGB0000425267</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Universiteit Utrecht</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Instatie voor Dierenwelzijn	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
Straat en huisnummer	Instatie voor Dierenwelzijn																
Postbus	12007																
Postcode en plaats	3501AA Utrecht																
IBAN	NL27INGB0000425267																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="width: 20%;">☐ Dhr. ☒ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☐ Dhr. ☒ Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="width: 20%;">☐ Dhr. ☒ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☐ Dhr. ☒ Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

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

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?	☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3		
	☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2		
	☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3		
2.2 Is dit een <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	0 1 . 0 2 . 2 0 1 6
	Einddatum	0 1 . 0 2 . 2 0 1 8
3.2 Wat is de titel van het project?	Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Effect van gezondheidsbevorderende bacteriën in een muismodel voor allergische astma	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Utrecht
	Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
	E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

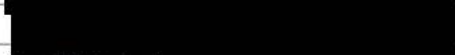
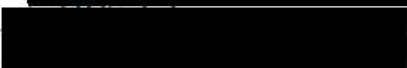
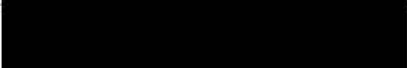
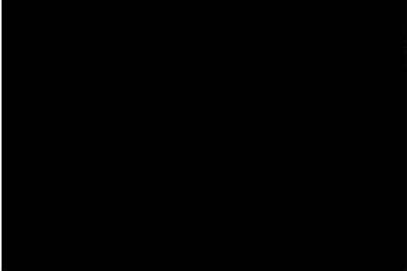
4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege ☐ Wijziging € Lege
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. <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>	☐ Via een eenmalige incasso ☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht ☒ Projectvoorstel ☒ Niet-technische samenvatting Overige bijlagen, indien van toepassing ☐ Melding Machtiging ☒ Beschrijving dierproef 3.4.4.1
-----	------------------------------	--

6 Ondertekening

6.1	Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar: Centrale Commissie Dierproeven Postbus 20401 2500 EK Den Haag	Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart: - dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn. - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid. - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen. - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag. - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.
		Naam  Functie  Plaats  Datum  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.

Allergische astma is een steeds meer voorkomende chronische aandoening van de luchtwegen. Volgens de Wereld Gezondheid Organisatie lijden ruim 235 miljoen mensen wereldwijd aan deze ziekte. Tegenwoordig wordt astma voornamelijk behandeld met luchtwegverwijders en ontstekingsremmers, zoals langwerkende bèta-agonisten (vb. salmeterol) en glucocorticosteroïden (vb. budesonide). Deze medicijnen kunnen de symptomen van astma (bv. kortademigheid) en de allergische ontsteking verminderen, maar behandelen niet de oorzaak (dit zijn dus echte symptoom bestrijders). Helaas hebben voornamelijk de ontstekingsremmers zoals glucocorticosteroïden verschillende bijwerkingen, zoals gewichtsverlies, verminderde groei bij kinderen en verminderde spierkracht.

Probiotica zijn micro-organismen, die indien in gepaste hoeveelheden toegediend, een positief effect kunnen hebben op de gezondheid. Voorbeelden zijn *Bifidobacterium* en *Lactobacillus* bacteriën. Uit literatuur is gebleken dat probiotica de balans tussen Th1 en Th2 kunnen verschuiven naar Th1 (astma heeft een Th2 respons) en tevens zorgt voor de productie van het anti-inflammatoire cytokine IL-10 (Shida et al., Clin Exp Allergy, 2002; Moore et al., Clin Exp Allergy, 2001).

Het is nog niet mogelijk om astma en de inductie en modulatie van het ziekteproces volledig na te bootsen door middel van alternatieve testen. Het proces is daarvoor te complex. In de afgelopen jaren zijn er diermodellen ontwikkeld waarin allergische astma bestudeerd kan worden (Heger et al., PLoS Biol., 2014; Kool et al., Immunity, 2011; Hammad et al., J Exp Med, 2010). De muizen worden allergisch gemaakt met behulp van huisstofmijt, omdat muizen geen spontane (meetbare) allergie kunnen ontwikkelen. Na sensitisatie en challenge laten de muizen manifestaties van allergische astma zien zoals we die vergelijkbaar zijn met de symptomen in patiënten. Er ontstaat een ontsteking van de longen met als belangrijkste ontstekingscel de eosinofiel granulocyt. Na een aerosol met metacholine wordt de weerstand van de longen gemeten (mate van benauwdheid). Verscheidene cytokines (zoals IL-4, IL-5 en IL-13) nemen toe in de longspoeling net zoals bij astma patiënten het geval is (Verheijden et al., Respir Res, 2015; Kool et al., Immunity, 2011; Holgate, Nat Med, 2012). Hierdoor is dit model uitermate geschikt om te kijken naar preventieve en therapeutische mogelijkheden voor het voorkomen/behandelen van allergische astma. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de probiotica kan alleen in de muis doordat de allergische en astmatische reactie het gevolg is van veel type leukocyten van het immuunsysteem en specifiek in de long. De interactie van fysiologische processen in en tussen multi-cellulaire organen kan op geen enkele manier worden bestudeerd dan in het proefdier.

Er is een uitgebreide literatuur screening gedaan om vast te stellen welke experimenten al zijn uitgevoerd met probiotica in allergische astma en welke vragen nog beantwoord dienen te worden voordat de stap gemaakt kan worden naar de kliniek. Het testen van de effectiviteit van probiotica in een diermodel en het onderzoeken van het mechanisme zal hieraan bijdragen.

Voorbeelden van voedingssupplementen uit eerder onderzoek zijn:

prebiotica (Verheijden et al., Resp Res, 2015) met name galacto-oligosaccharide (GOS), probiotica (Sagar et al., Resp Res 2014) en/of combinaties ervan

(Verheijden *et al.*, *Eur J Nutr*, 2015; Sagar *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 2014) en nog niet gepubliceerde resultaten uit vorige experimenten waarin we gevonden hebben dat specifieke probiotica een effect kunnen hebben op de luchtwegweerstand (mindere mate van benauwdheid) OF ontsteking van de longen, maar niet op de het remmen van beide processen. Tevens is uit literatuuronderzoek is gebleken dat verschillende *Lactobacillus* (vb. *Lactobacillus Helveticus*, *Lactobacillus Casei*, *Lactobacillus Rhamnosus* etc.) en *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium Breve*, *Bifidobacterium Bifidum* etc.) een effect kunnen hebben op luchtwegweerstand of ontsteking van de longen (Kim *et al.*, *J. Appl. Microbiol.* 2013; MacSharry *et al.*, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2012; Jang *et al.*, *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2012). In al deze experimenten is gebruik gemaakt van een ovalbumine geïnduceerd astma model, waarbij gebruikt wordt gemaakt van een adjuvans. Bij het huisstofmijtmodel daarentegen wordt er gebruik gemaakt van een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de humane situatie. Tevens is in deze studies de mate van benauwdheid gemeten met behulp van de Penh meting. Deze meting staat onder discussie omdat hiermee niet de longweerstand wordt gemeten, maar veranderingen in de hoge luchtwegen (met name de neus) (Verheijden *et al.*, *Front. In Pharm.*, 2014). In dit experiment wordt gebruik gemaakt van de longweerstandmeting waarbij wel de mate van benauwdheid gemeten wordt.

Met behulp van dit project willen we door middel van verschillende (combinaties) probiotica proberen om zowel de luchtwegweerstand als ook de mate van ontsteking te remmen, combinaties van probiotica worden ook gebruikt om te onderzoeken of er hier een additieve werking van de probiotica ontstaat. Beide mechanismen zijn belangrijke parameters in astma patiënten. Tevens is de mate van ontsteking niet gerelateerd aan de mate van benauwdheid, wat dus inhoudt dat beide mechanisme los staan van elkaar. Verschillende klinische trials zijn uitgevoerd met antilichamen die gericht zijn tegen IL-5 (een belangrijke cytokine in astma). Ook hieruit is gebleken dat ze alleen effect hebben op de ontsteking en niet op de luchtwegweerstand. Daarom is het belangrijk om zowel luchtwegweerstand als ook de ontsteking te remmen.

In dit project wordt gebruik gemaakt van verschillende *Lactobacillus* bacteriën (vb. *Lactobacillus Helveticus*, *Lactobacillus Casei*, *Lactobacillus Rhamnosus* etc.) en *Bifidobacterium* bacteriën (*Bifidobacterium Breve*, *Bifidobacterium Bifidum* etc.). Uit literatuur is gebleken dat deze probiotica een effect kunnen hebben op luchtwegweerstand of ontsteking van de longen (Kim *et al.*, *J. Appl. Microbiol.* 2013; MacSharry *et al.*, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2012; Jang *et al.*, *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2012).

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 hoofddoel van dit project is het onderzoeken of losse probiotica of combinaties hiervan astma symptomen kunnen onderdrukken of verminderen, dit in preventie studies en behandel studies. In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensibilisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensibilisatie), waarna de behandeling met probiotica start. Door gebruik te maken van losse probiotica of combinaties hiervan willen we zowel de luchtwegweerstand (mate van benauwdheid) als de mate van ontsteking remmen in huisstofmijt allergische muizen. Combinaties van probiotica worden gebruikt om te onderzoeken of er hier een additieve werking van de probiotica ontstaat. Hierbij willen wij ook het werkingsmechanisme onderzoeken. Dit project zal fundamentele kennis opleveren die in de toekomst mogelijk kan bijdragen aan vervolgonderzoek en op lange termijn het testen van de genoemde strategie in een klinische studie. Binnen de projectduur van 2 jaar is deze doelstelling realistisch en haalbaar vanwege de uitgebreide expertise die binnen de projectgroep aanwezig is. Vanwege het voorbereidende onderzoek naar verscheidene voedingssupplementen wat voorafgaand aan dit project is uitgevoerd, wordt verwacht dat het hoofddoel haalbaar is.

3.3 Belang

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

Allergische astma is een ernstig gezondheidsprobleem wat enorm is toegenomen de afgelopen jaren. Voor allergische astma behoren corticosteroïden tot de reguliere behandeling maar deze zijn ingrijpend en kunnen bijwerkingen vertonen. Muismodellen zijn van belang voor het ophelderen van het mechanisme onderliggend aan allergische astma. Mogelijk dat dit onderzoek kan leiden tot meer inzicht in het ontstaan van allergische astma en de immuunmodulatorische effecten van verschillende probiotica. Dit kan leiden tot een meer gerichte dieet-interventie. Als aangetoond kan worden dat probiotica de allergische symptomen kunnen verminderen of voorkomen zou dit gemakkelijk toegepast kunnen worden in de vorm van klinische voeding.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Binnen dit project zal onderzocht worden of probiotische voedingssupplementen de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de ziekteverschijnselen kunnen verminderen in een huisstofmijt geïnduceerd astma model in muizen (een preventief model en een behandel model met probiotica). Naast losse probiotica zullen er ook combinaties van probiotica gebruikt worden. Dit om te onderzoeken of deze combinaties een additieve werking hebben. Door gebruik te maken van losse probiotica of combinaties hiervan willen we zowel de mate van benauwdheid als de mate van ontsteking remmen in huisstofmijt allergische muizen.

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

In dit project wordt gebruik gemaakt van het al bestaande muismodel voor allergische astma (Verheijden et al., *Resp Res*, 2015). Het is nog niet mogelijk om het proces van allergische astma volledig te bootsen door middel van alternatieve testen. Het proces is daarvoor te complex.

In de afgelopen jaren zijn er diermodellen ontwikkeld waarin allergie-inductie voor astma bestudeerd kan worden (Kool et al., *Immunity*, 2011; Hammad et al., *J Exp Med*, 2010). De muizen worden allergisch gemaakt met behulp van huisstofmijt, omdat de muizen geen spontane (meetbare) allergie kunnen ontwikkelen. Na sensitisatie en challenge laten de muizen echter veel, al dan niet alle manifestaties van astma zien zoals we die ook in patiënten zien. Er ontwikkelen zich ontstekingscellen (met name eosinofiele granulocyten), allergeen-specifieke T cellen, en er kan benauwdheid gemeten worden na aerosol met metacholine (Verheijden et al., *Respir Res*, 2015; Kool et al., *Immunity*, 2011). Hierdoor is dit model uitermate geschikt om te kijken naar preventie en behandel methodes in allergische astma. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de probiotica kan alleen in de muis doordat het gebruik van weefsels noodzakelijk is. Muizen worden behandeld met verschillende probiotica, waarvan we willen testen of deze de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de ziekteverschijnselen kunnen verminderen. In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie) waarna de behandeling met probiotica start (de behandeling start dan voor de challenge met huisstofmijt). Als referentie behandeling worden de muizen behandeld met budesonide, een corticosteroïd, waarvan al gebleken is uit literatuur dat deze een effect hebben op de behandeling van astma (Sagar et al., *Resp Res.*, 2014; Verheijden et al., *Resp Res*, 2015) en die ook door astmatische patiënten gebruikt wordt. Tevens maken we gebruik van een referentie probiotica. Deze referentie probiotica (*L. Rhamnosus*) wordt in de literatuur beschreven effectief te zijn in astma modellen in de muis (Wu et al., *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2014; Kim et al., *J. Appl. Microbiol.*, 2013; Jang et al., *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2012; Sagar et al., *Respir. Res.*, 2014). Nadeel van deze studies is dat het probiotica getest is in ovalbumine astma modellen waarbij gebruikt wordt gemaakt van een adjuvans. Bij het huisstofmijtmodel daarentegen wordt er gebruik gemaakt van een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de humane situatie. Tevens is uit de literatuur gebleken dat de *L. Rhamnosus* vaak alleen een effect heeft op ontsteking OF luchtwegweerstand. Zowel budesonide als de referentie probiotica worden gebruikt om een vergelijking te kunnen maken met de effectiviteit van de probiotica die we gaan testen. Tevens zullen we probiotica met elkaar gaan combineren en testen of deze een additieve werking hebben.

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.

Uit eerdere studies zijn een aantal werkzame probiotica geselecteerd. Deze probiotica hadden effect op ontsteking of luchtwegweerstand. In de huidige

studie worden deze losse probiotica en combinaties hiervan gemaakt om te testen of deze mogelijk een additieve werking hebben. De probiotica zullen getest worden in een preventief en een behandel model. Inzicht in specifieke veranderingen die optreden op immunologisch niveau levert wetenschappelijke kennis op die in de toekomst een bijdrage zou kunnen leveren aan vervolgonderzoek en aan het testen van de strategie in een klinische studie.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Huisstofmijt geïnduceerd model voor allergische astma
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.	10800				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>1</td><td>Huisstofmijt geïnduceerd model voor allergische astma</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Huisstofmijt geïnduceerd model voor allergische astma
Volgnummer	Type dierproef					
1	Huisstofmijt geïnduceerd model voor allergische astma					

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.

Om de doelstelling van deze projectaanvraag te bereiken zullen wij gebruik maken van het al ontwikkelde muismodel voor huisstofmijt allergische astma (Verheijden et al., *European Journal of Nutrition* 2015; Verheijden et al., *Respiratory Research*, 2015). In dit model worden muizen intranasaal gesensitiseerd met huisstofmijt of PBS en intranasaal gechallenged met huisstofmijt of PBS. Met behulp van het huisstofmijt model in de muis kunnen wij onderzoeken welk type behandeling het meest geschikt is om de acute allergische response te voorkomen/verminderen en/of lange termijn bescherming tegen de allergie te bevorderen. Om de effectiviteit en de veiligheid te bepalen zal gebruik gemaakt worden van klinische parameters om de mate van de allergische response vast te stellen. Voorbeeld hiervan is de luchtwegfunctie (weerstand) meting na toediening van methacholine. Methacholine is een stof

waardoor de longen samentrekken. De verneveling van methacholine wordt ook gebruikt in de kliniek (de provocatie test). Om te onderzoeken wat er mechanistisch gebeurt, zullen wij naast klinische parameters ook kijken naar cellulaire en humorale parameters die we meten in de broncho-alveolaire lavage (BAL, longspoeling) en organen. Het aantal ontstekingscellen in de BAL wordt geteld, met als belangrijkste celtype de eosinofiel (*Verheijden et al., European Journal of Nutrition 2015; Verheijden et al., Respiratory Research, 2015*). In dit experiment worden dieren behandeld met budesonide (1), probiotica (2), referentie probiotica (3).

- (1) Budesonide is een corticosteroïd wat behoort tot de voorgeschreven medicamenten in astma patiënten. De dieren worden intratracheaal (oropharyngeaally) behandeld met budesonide. Op de dagen waarop ook huisstofmijt challenge plaatsvindt, 6 uur voor de challenge. Uit eerdere studies is gebleken dat budesonide luchtwegweerstand (benauwdheid) en eosinofiele influx in huisstofmijt allergische muizen kan verlagen. (data verkregen uit eerdere experimenten)
- (2) Probiotica interventie; probiotica zijn van nature voorkomende bacteriën in de darm die een gunstige invloed hebben op onze afweer. De dieren worden vanaf dag -1 tot het eind van het experiment (dag 14) oraal (gavage) behandeld met verschillende soorten probiotica (preventie studie) of start voor challenge, maar na sensitisatie (behandel studie). Door middel van behandeling met probiotica wordt verwacht dat de mate van ontsteking en benauwdheid in mindere mate aanwezig zullen zijn. De keuze van de **probiotica** is gebaseerd op eerder in-vitro en in-vivo onderzoek waaruit gebleken is dat deze **probiotica** de cytokine productie verminderen (in-vitro) en ontsteking of mate van benauwdheid verminderen (in-vivo).
- (3) Referentie **probioticum** (*L. Rhamnosus*); van deze **probioticum** is uit de literatuur gebleken dat deze effect heeft in allergische astma modellen in de muis (met name verlaging van ontsteking of mate van benauwdheid) (*Wu et al., J. Microbiol. Immunol. Infect., 2014; Kim et al., J. Appl. Microbiol., 2013; Jang et al., Allergy Asthma Immunol. Res., 2012; Sagar et al., Respir. Res., 2014*). Deze wordt dan ook gebruikt om de werking van de nieuwe probiotica mee te vergelijken. De dieren worden vanaf dag -1 tot het eind van het experiment (dag 14) oraal (gavage) behandeld met het referentie **probioticum** (preventie studie) of start voor challenge, maar na sensitisatie (behandel studie).
- (4) Combinaties van probiotica; **Probiotica** kunnen ontsteking en mate van benauwdheid remmen in een astmatisch muizen model. Door probiotica te combineren willen we kijken of het effect vergroot kan worden. De dieren worden vanaf dag -1 tot het eind van het experiment (dag 14) oraal (gavage) behandeld met combinaties van probiotica (preventie studie) of start voor challenge, maar na sensitisatie (behandel studie). In eerdere studies die uitgevoerd zijn, zien we dat enkele probioticum een effect hebben op ontsteking en andere een effect op het verbeteren van de longfunctie.

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 dieren worden intranasaal gesensitiseerd (1x) met PBS (negatieve controle) of huisstofmijt (positieve controle). Gedurende 5 dagen, 1 maal per dag worden de dieren gechallenged met PBS (negatieve controle) of huisstofmijt (positieve controle). Sensitisatie en challenge vinden beide plaats onder isofluraan anesthesie (totaal 6x, 3 min per keer).

Negatieve controle dieren worden gesensitiseerd en gechallenged met PBS; positieve controle dieren worden gesensitiseerd en gechallenged met huisstofmijt. Dieren worden 4x intratracheaal (oropharyngeaally) behandeld met budesonide, onder isofluraan anesthesie (totaal 4x, 3 min per keer). Op dagen waarop de huisstofmijt challenge plaatsvindt, worden de dieren 6 uur voor de challenge behandeld met budesonide. Probiotica (losse probiotica, referentie probiotica of combinaties van probiotica) behandeling (oraal) vindt plaats vanaf dag -1 tot het eind van het experiment (preventie studie) of na sensitisatie, maar voor

challenge (behandel studie), 3 maal per week (1 min per keer). Op dag 14 wordt de luchtwegweerstand gemeten, na metacholine toediening, onder terminale anesthesie. Indien gewenst kan op bepaalde tijdstippen tijdens het experiment bloed worden afgenomen en feces monsters worden verzameld. De dieren worden tijdens de feces verzameling voor korte periode apart gehuisvest.

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

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen. Negatieve controle dieren worden gesensitiseerd en gechallengeed met PBS; positieve controle dieren worden gesensitiseerd en gechallengeed met huisstofmijt. Het gekozen aantal groepen is wat minimaal nodig is om de juiste vergelijkingen te kunnen maken en om betrouwbare resultaten te krijgen. De groeps grootte wordt bepaald aan de hand van een relevante parameter. Per experiment kan bepaald worden welke parameter het meest relevant is. Hier kan bijvoorbeeld gekozen worden voor luchtwegweerstand of eosinofiele cel telling.

Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groeps grootte dus op de aantallen die uit de powerberekening komen. Ter verduidelijking een voorbeeld studie met bijbehorende groepsindeling (PB: probiotica; HDM: huisstofmijt):

A n=9 PBS sensitisatie --- PBS challenge (NEGATIEVE CONTROLE)
B n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge (POSITIEVE CONTROLE)
C n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge + Budesonide
D n= n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge + referentie PB
E n= n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge + PB1
F n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge + PB2
G n=9 HDM sensitisatie --- HDM challenge + PB1 + PB2

Naar analogie van eerdere aanwijzingen van statistiek afdeling hebben we een poweranalyse uitgevoerd op voor dit onderzoek constante en belangrijke parameters. Het gaat hier om een continue uitkomst. Hieronder zal de berekening worden weergegeven.

1. Continue uitkomst – Luchtwegweerstand

In het proefdiermodel staat de luchtwegfunctie centraal en wordt er gekeken naar een aantal parameters (in dit punt luchtwegweerstand) daarin op dag 14. De dieren worden daarbij blootgesteld aan oplopende doseringen methacholine, die per aerosol toegediend worden. Bij validatie van het model zijn de volgende resultaten (cm H₂O/ml/sec) naar voren gekomen:

Huisstofmijt-ge sensibiliseerde en PBS gechallengeerde muizen (controle groep): 2.78 ± 1.26 (sd)

Huisstofmijt-ge sensibiliseerde en huisstofmijt gechallengeerde muizen (experimentele groep): 4.60 ± 1.41 (sd)

δ = verschil tussen beide gemiddelde waarden = $|4.60 - 2.78| = 1.82$

σ = sd hdm = 1.41

formule: $n \geq \frac{2\sigma^2}{\delta^2} \cdot (1.96 + 0.842)^2 = 9$ muizen/groep

B. De dieren

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

Het type diersoort dat zal worden gebruikt in het allergisch astma model is de muis, de BALB/c By JcCo stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De BALB/c muis die wij gebruiken is gevoelig voor de inductie van allergische astma (*Hammad et al., Journal of Experimental Medicine, 2010; Verheijden et al., 2015, Respiratory Research*).

Dit model is gevalideerd in mannelijke muizen. We kunnen geen combinatie van mannelijke en vrouwelijke muizen gebruiken omdat dit zal leiden tot een grotere spreiding waardoor er meer dieren nodig zijn om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelgroepen. Tevens hebben wij in een eerdere studie aangetoond dat onze belangrijkste parameter (luchtwegweerstand) geen verschillen oplevert in vrouwelijke muizen en wel in mannelijke muizen (zie figuur bijlage). Bovengenoemde bevindingen en onze ervaringen binnen onze afdeling (validatie model in mannen en bijbehorende poweranalyses) liggen ten grondslag aan de keuze voor mannelijke muizen.

Het aantal dieren dat wij verwachten te gebruiken binnen het allergisch astma model is 756 over een periode van 2 jaar.

Naar verwachting zullen we de **probiotica** los van elkaar en in combinatie met elkaar testen in een preventie studie en behandel studie, met als controle behandeling: budesonide en een referentie probioticum (*L. Rhamnosus*). In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie), waarna de behandeling met probiotica start.

Per experiment zullen er ongeveer 63 muizen nodig zijn om alle controle- en behandelgroepen mee te kunnen nemen. Op basis van eerder onderzoek, literatuurstudie, doses probiotica en verschillende tijdstippen van interventie komt dit uit op **12 studies x 63 muizen per studie = 756 muizen voor dit type experiment.**

Bij elk experiment zijn standaard de volgende groepen inbegrepen:

Positieve controle

Negatieve controle

Budesonide groep

Referentie probioticum groep

Daarnaast worden er maximaal 6 verschillende probioticum getest, los van elkaar of in combinaties van 2 of 3. Enkele voorbeelden van probioticum die gebruikt worden zijn *Lactobacillus Helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium Bifidum*, *Bifidobacterium Longum* etc.

Voorbeelden van studies:

1	3	1	1	2	2	1
2	4	3	4	3	4	2
1+2	3+4	1+3	1+4	2+3	2+4	3
						1+2+3

Etc.

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.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met in acht neming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

Vervanging: Het huisstofmijt allergisch astma model is ontworpen om de ontwikkeling en modulatie van astma te kunnen onderzoeken en vanwege de complexiteit is het niet mogelijk dit volledig in vitro na te bootsen. Om het effect van een dieetinterventie met probiotica te onderzoeken hebben wij een compleet organisme nodig.

Vermindering: Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de juiste vergelijkingen maken zodat we optimale uitkomsten kunnen behalen, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening. Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald (zie uitleg punt A). Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groeps grootte exact berekenen.

Verfijning: De keuze om deze muissoort te gebruiken binnen deze proefopzet is onderbouwd bij punt B en daarnaast hebben wij de mate van ongerief binnen het model zo veel mogelijk beperkt door kennis uit eerdere (pilot) experimenten te gebruiken wat betreft huisstofmijt sensibilisatie en challenge dosering en budesonide behandeling. Het eventuele ongerief wat kan optreden kunnen we zoveel mogelijk beperken, maar niet voorkomen. Het ongerief wordt zo veel mogelijk beperkt door de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren door ervaren medewerkers.

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.

Muizen worden gehuisvest in een gespecialiseerde dierfaciliteit en verzorgd door gecertificeerd personeel. Muizen worden in groepen gehuisvest in kooien met standaard bedding en kooiverrijking. Tijdens het experiment hebben de muizen onbeperkt toegang tot water en voedsel. Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Wanneer een dier onverwacht ernstig ongerief ondervindt wordt besloten het dier te doden.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Vanwege de frequentie van behandeling en anesthesie, kunnen de dieren stress ervaren.

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

Om stress zoveel mogelijk te beperken wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak tot een minimum wordt beperkt.

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.

Bij dit experiment worden geen omstandigheden verwacht waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd worden, dit omdat de muizen geen symptomen van allergie ondervinden na sensitisatie en challenge.

Tijdens de dagelijkse controle door de diervverzorgers en de reguliere controles door de projectleden zullen acties ondernomen worden wanneer hoog uitzonderlijke abnormaliteiten zoals abnormaal gedrag, beweging, ernstig gewichtsverlies of wondjes waargenomen worden. In dit geval zal er actie ondernomen worden door eventueel het dier individueel te huisvesten en/of er wordt contact opgenomen met de diervverzorgers en/of de

proefdierdeskundige om te kijken of het dier uit het experiment gehaald moet worden om onnodig ongerief te voorkomen.

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.

Positieve controle groep en negatieve controle groep:

6x anesthesie (isofluraan, 3 min per keer) voor sensitisatie en challenge inclusief bijkomen → **matig ongerief**

Budesonide groep:

6x anesthesie (isofluraan, 3 min per keer) voor sensitisatie en challenge inclusief bijkomen → **matig ongerief**

budesonide behandeling 4x anesthesie (isofluraan, 3 min per keer) → **matig ongerief**

Probiotica groepen:

6x anesthesie (isofluraan, 3 min per keer) voor sensitisatie en challenge inclusief bijkomen → **matig ongerief**

Probiotica behandeling d.m.v. gavage → **licht ongerief**

De luchtwegfunctiemeting inclusief metacholine aerosol vindt plaats onder terminale anesthesie en levert geen bijdrage aan het totaal ondervonden ongerief.

Hierdoor zal het ongerief van alle dieren binnen het huisstofmijt allergische model worden geclassificeerd als **matig ongerief**.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De dieren die worden gebruikt in dit type dierexperiment zullen na afloop van het experiment worden gedood vanwege de noodzaak om organen en bloed te verzamelen voor verdere analyse in het laboratorium.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.858.036
2. Titel van het project : "Effecten van probiotica-stammen in een muismodel voor allergische astma"
3. Titel van de NTS : Het effect van gezondheidsbevorderende bacteriën op allergische astma

4. Type aanvraag:

- ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
- ☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht

Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247

Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ☒ ontvangen door DEC: 10-09-2015
- ☐ aanvraag compleet:
- ☒ in vergadering besproken: 30-09-2015 en 21-10-2015
- ☒ anderszins behandeld: per mail: 04-11-2015
- ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 05-10-2015 tot 09-10-2015
23-10-2015 tot 04-11-2015
- ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- ☐ aanpassing aanvraag:
- ☒ advies aan CCD: 17-12-2015

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: 05-10-2015
- Strekking van de vragen:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: De DEC adviseert u om aan de eerste zin toe te voegen: 'In dit project willen we ... of ze allergie kunnen verminderen of voorkomen...'
- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Tevens adviseert de DEC u om de laatste zin te formuleren als volgt: '... die effect heeft op zowel de mate van benauwdheid als ook op de mate van ontsteking.' Dat geeft beter weer dat het juist om de combinatie gaat.
- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: De DEC is van mening dat de toelichting hier wat summier is en verzoekt u ook in te gaan op ongerief dat voortkomt uit benauwdheid, anesthesie, longfunctiemetingen, etc.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Hetgeen al bekend is over effecten van probiotica op luchtweg allergie uit de literatuur en uit eigen onderzoek is buitengewoon summier opgeschreven. Het is de DEC niet duidelijk wat er nog niet bekend is c.q. wat dit onderzoek toevoegt aan hetgeen al bekend is. De DEC verzoekt u deze informatie alsnog op te nemen in het projectvoorstel.
- 3.1 Achtergrond: De DEC wil graag inzage in de te testen stammen. Het is voor de DEC nu niet mogelijk om een goede afweging te maken. Indien de probiotica stammen die u gebruikt geheim zijn vragen wij u deze voor te leggen aan een door de DEC te vragen expert op dit gebied. De expert zal de DEC vervolgens adviseren zonder de geheime informatie met de DEC te delen.
- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u de termen inflammatie en reactiviteit beter te definiëren en aan te geven wat het verband c.q. het verschil is. Het lijkt erop dat u op zoek bent naar probiotica die beide mechanismen beïnvloeden, alleen of in combinatie. Dit moet helder in de hypothese worden opgenomen.
- 3.2 Doel: U dient zich hier te beperken tot het doel. Tekst over de reeds behaalde resultaten moet naar 3.1 achtergrond, evenals de literatuurgegevens.
- 3.2 Doel: Het doel graag duidelijker beschrijven.
- 3.2 Doel: U gebruikt hier de term 'preklinisch', wat verwarrend is want dit lijkt hier niet aan de orde. Graag verwijderen.
- 3.2 Doel/3.4 Onderzoeksstrategie: U beschrijft indirect wat de hypothese is, namelijk dat de door u gekozen (combinatie van) probiotica effectief zal zijn, omdat deze effect hebben op zowel luchtwegreactiviteit als ook op ontsteking van de longen. Dat zou meer expliciet en uitgebreid bij het doel (en eigenlijk ook al in de achtergrond) opgenomen moeten worden. Graag alsnog doen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC mist hier de criteria waarbij u het besluit neemt om in muismodel voor allergische astma te gaan onderzoeken. Met andere woorden: de inclusiecriteria ontbreken. Graag alsnog opnemen.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De onderbouwing voor de benodigde aantallen dieren is onvoldoende. De N=9 graag nader onderbouwen.
- B. De dieren: In twee jaar worden 12 proeven gedaan, elk met 63 dieren. Betekent dat 36 verschillende probiotica? Graag verhelderen.
- B. De dieren: De DEC verzoekt u het gebruik van uitsluitend mannelijke dieren beter te motiveren.
- B. De dieren: Op p.3, onderste alinea staat: 'Naar verwachting zullen we probiotische stammen los van elkaar en in combinatie van elkaar testen (preventie en behandelstudie).' Deze zin is wat verwarrend. Of iets een preventie- of behandelstudie is wordt bepaald door het tijdstip van interventie, en niet door de in te zetten probiotica. De zin daarom graag wijzigen.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Onder verfijning staat de zin 'Het eventuele ongerief wat kan optreden kunnen we zoveel mogelijk beperken, maar niet voorkomen'. Hier graag ook aangeven hoe u het ongerief zoveel mogelijk gaat beperken.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Hier geeft u aan dat u alleen stress voorziet als eventuele andere vorm van welzijnsaantasting. De DEC vraagt zich af of u niet ook benauwdheid verwacht?
- J. Humane eindpunten: De humane eindpunten zijn niet ingevuld. Graag alsnog doen.
- K. Classificatie van ongerief: U geeft aan dat alle dieren matig ongerief ervaren. De DEC kan zich voorstellen dat de dieren uit de controlegroep (budesonide-behandeling) door 4x extra anesthesie uiteindelijk ook uitkomen op matig ongerief, maar ziet echter wel graag dat het cumulatieve ongerief voor de controle en experimentele groepen afzonderlijk en duidelijker opgeschreven wordt.

Algemeen

- De DEC adviseert u contact op te nemen met de IvD voor een betere afstemming van, met name, bijlage 1. Daarnaast wordt in het projectvoorstel probioticum (enkelvoud) en probiotica (meervoud) door elkaar gebruikt. Graag corrigeren.
- Datum antwoord: 09-10-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Deze zin is aangepast in de niet technische samenvatting.
- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Deze zin is aangepast in de niet technische samenvatting.
- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren: De verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zijn: Het toedienen van huisstofmijt, PBS en luchtwegverwijder. Dit vindt plaats onder anesthesie, hier kunnen de dieren ongerief van ondervinden. Tevens zullen de muizen licht ongerief ervaren tijdens het vastpakken en

tijdens het toedienen van de probiotica. Muizen hebben geen last van benauwdheid na challenge met huisstofmijt. Alleen tijdens de luchtwegfunctiemeting wordt benauwdheid gemeten, omdat er een prikkel wordt gegeven waardoor de spieren in de luchtwegen samentrekken, maar hierbij zijn de dieren onder anesthesie. De hoeveelheid behandelingen kan wel stress veroorzaken. De dieren ondervinden geen blijvende effecten van een allergische reactie.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De effecten van probiotica op astma waren inderdaad summier opgeschreven. Daarom hebben we geprobeerd om deze uitgebreider te omschrijven inclusief de toevoegende waarde van dit onderzoek. Uit literatuuronderzoek is gebleken dat *Lactobacillus* stammen (vb. *Helveticus*, *Casei*, *Rhamnosus* etc.) en *Bifidobacterium* stammen (*Breve*, *Bifidum* etc.) een effect kunnen hebben op luchtwegweerstand of ontsteking van de longen (Kim et al., *J. Appl. Microbiol.* 2013; MacSharry et al., *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2012; Jang et al., *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2012). In al deze experimenten is gebruik gemaakt van een ovalbumine geïnduceerd astma model, waarbij gebruikt wordt gemaakt van een adjuvans. Bij het huisstofmijtmodel daarentegen wordt er gebruik gemaakt van een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de humane situatie. Tevens is in deze studies de mate van benauwdheid gemeten met behulp van de Penh meting. Deze meting staat onder discussie omdat hiermee niet de longweerstand wordt gemeten, maar veranderingen in de hoge luchtwegen (met name de neus) (Verheijden et al., *Front. In Pharm.*, 2014). In dit experiment wordt gebruik gemaakt van de longweerstandmeting waarbij wel de mate van benauwdheid gemeten wordt. Door in dit experiment nieuwe losse probiotica stammen of combinaties hiervan te testen willen we zowel de mate van benauwdheid als ook de mate van ontsteking remmen. Mogelijk zorgen combinatie van probiotica stammen voor een additieve werking op deze parameters.
- 3.1 Achtergrond: De te testen stammen zijn niet geheim. In dit project wordt gebruik gemaakt van verschillende *Lactobacillus* stammen (vb. *Helveticus*, *Casei*, *Rhamnosus* etc.) en *Bifidobacterium* stammen (*Breve*, *Bifidum*, *Longum* etc.).
- 3.1 Achtergrond: We begrijpen dat de termen inflammatie en reactiviteit niet helemaal duidelijk zijn en hebben deze daarom aangepast in ontsteking en luchtwegweerstand in de gehele aanvraag. Na sensitisatie en challenge laten de muizen manifestaties van allergische astma zien zoals die vergelijkbaar zijn met de symptomen in patiënten. Er ontstaat een inflammatie (ontsteking) van de longen met als belangrijkste ontstekingscel de eosinofiele granulocyt. Deze cellen worden geteld na spoeling van de longen. Na een aerosol met metacholine wordt de weerstand van de longen gemeten (mate van benauwdheid). Verscheidene cytokines (zoals IL-4, IL-5 en IL-13) nemen toe in de longspoeling net zoals bij astmapatiënten het geval is (Verheijden et al., *Respir Res*, 2015; Kool et al., *Immunity*, 2011; Holgate, *Nat Med*, 2012). Met behulp van dit project willen we door middel van verschillende (combinaties) probiotica stammen proberen om zowel de luchtwegweerstand als ook de mate van ontsteking te remmen. Beide mechanismen zijn belangrijke parameters in

astmapatiënten. Tevens is de mate van ontsteking niet gerelateerd aan de mate van benauwdheid, wat dus inhoudt dat beide mechanisme los staan van elkaar. Verschillende klinische trials zijn uitgevoerd met antilichamen die gericht zijn tegen IL-5 (een belangrijke cytokine in astma). Ook hieruit is gebleken dat ze alleen effect hebben op de ontsteking en niet op de luchtwegweerstand (Leckie et al., Lancet, 2000; Flood-Page et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2007). Daarom is het belangrijk om zowel luchtwegweerstand als ook de ontsteking te remmen.

- 3.2 Doel: Is verplaatst naar 3.1 achtergrond.
- 3.2 Doel: Het hoofddoel van dit project is het onderzoeken of losse probiotica stammen of combinaties hiervan astmasymptomen kunnen onderdrukken of verminderen, dit in preventie studies en behandel studies. In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie), waarna de behandeling met probiotica start. Door gebruik te maken van losse probiotica of combinaties hiervan willen we zowel de luchtwegweerstand (mate van benauwdheid) als de mate van ontsteking remmen in huisstofmijt allergische muizen. Combinaties van probiotica stammen worden gebruikt om te onderzoeken of er hier een additieve werking van de probiotica stammen ontstaat.
- 3.2 Doel: Is aangepast.
- 3.2 Doel/3.4 Onderzoeksstrategie: De hypothese is in zowel het doel en de achtergrond explicieter beschreven.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Het is onderzoeker niet helemaal duidelijk wat de DEC hier bedoelt. We gaan ervan uit dat de DEC vraagt waarom we een muismodel gebruiken voor allergisch astma. Het is nog niet mogelijk om het proces van allergische astma volledig te bootsen door middel van alternatieve testen. Het proces is daarvoor te complex. In de afgelopen jaren zijn er diermodellen ontwikkeld waarin allergie inductie voor astma bestudeerd kan worden (Kool et al., Immunity, 2011; Hammad et al., J Exp Med, 2010). De muizen worden allergisch gemaakt met behulp van huisstofmijt, omdat de muizen geen spontane (meetbare) allergie kunnen ontwikkelen. Na sensitisatie en challenge laten de muizen echter veel, al dan niet alle manifestaties van astma zien zoals we die ook in patiënten zien. Er ontwikkelen zich ontstekingscellen (met name eosinofiele granulocyten), allergeen-specifieke T cellen, en er kan benauwdheid gemeten worden na aerosol met metacholine (Verheijden et al., Respir Res, 2015; Kool et al., Immunity, 2011). Hierdoor is dit model uitermate geschikt om te kijken naar preventie en behandel methodes in allergische astma. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de probiotica kan alleen in de muis doordat het gebruik van weefsels noodzakelijk is.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Naar analogie van eerdere aanwijzingen van de statistiek afdeling hebben we een poweranalyse uitgevoerd op voor dit onderzoek constante en belangrijke parameters. De powerberekening is opgenomen in de aanvraag bij punt A van bijlage 1.

- B. De dieren: Bij elk experiment zijn standaard de volgende groepen inbegrepen: 1) positieve controle, 2) negatieve controle, 3) Budesonide groep, en 4) referentie probiotica groep. Daarnaast worden er maximaal 6 verschillende stammen getest, los van elkaar of in combinaties van 2 of 3 stammen. Enkele stammen die gebruikt worden zijn Lactobacillus Helveticus, Lactobacillus Casei, Bifidobacterium Bifidum, Bifidobacterium Longum etc.

Voorbeelden van studies:

1	3	1	1	2	2	1
2	4	3	4	3	4	2
1+2	3+4	1+3	1+4	2+3	2+4	3
						1+2+3

- B. De dieren: Wanneer in studies gebruik gemaakt wordt van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen zal dit leiden tot een grotere spreiding en zijn er meer dieren nodig om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelgroepen. Indien de DEC de voorkeur geeft aan vrouwelijk muizen, dan zal eerst een experiment uitgevoerd moeten worden om het model te valideren in vrouwelijke muizen. Deze vergelijkende studie brengt het gebruik van extra proefdieren met zich mee. Het belangrijkste argument voor de onderzoekers is dat de vergelijking tussen geslachten niet het doel is van deze studie. Voor translatie zal dit uiteindelijk in de toekomst wel relevant zijn, maar dit valt buiten de onderzoeksvraag. Bovengenoemde bevindingen en onze ervaringen binnen onze afdeling (validatie model in mannen en bijbehorende poweranalyses) liggen ten grondslag aan de keuze voor mannelijke muizen.
- B. De dieren: Deze zin is aangepast in: Naar verwachting zullen we probiotische stammen los van elkaar en in combinatie met elkaar testen in een preventie studie en behandel studie, met als controle behandeling: budesonide en een referentie probiotica (L. Rhamnosus). In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie), waarna de behandeling met probiotica start.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Het ongerief wordt zo veel mogelijk beperkt door de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren door ervaren medewerkers.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Na sensitisatie en challenge vertonen de muizen geen benauwdheid. Alleen tijdens de luchtwegfunctiemeting wordt benauwdheid gemeten. Dit wordt dan geïnduceerd door een aerosol te geven met metacholine. Hierdoor trekken de spieren van de luchtwegen samen, omdat de dieren hierbij onder anesthesie zijn zullen ze hier geen ongerief van ondervinden.
- J. Humane eindpunten: De humane eindpunten zijn ingevuld onder punt J. Bij dit experiment worden geen omstandigheden verwacht waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd worden, omdat de muizen geen symptomen van allergie ondervinden na sensitisatie en challenge. Tijdens de dagelijkse controle door de diervverzorgers en de reguliere controles door de projectleden zullen acties ondernomen worden wanneer hoog uitzonderlijke abnormaliteiten zoals abnormaal gedrag, beweging, ernstig gewichtsverlies of wondjes waargenomen worden. In dit geval zal er actie ondernomen worden door eventueel het dier individueel te huisvesten en/of er wordt contact opgenomen met de diervverzorgers

en/of de proefdierdeskundige om te kijken of het dier uit het experiment gehaald moet worden om onnodig ongerief te voorkomen.

- K. Classificatie van ongerief: Het ongerief is nu voor alle groepen afzonderlijk beschreven.

Algemeen

- Dit is aangepast.
- Datum: 23-10-2015
- Strekking van de vragen:
- Bijlage 1, punt B: U heeft hier onvoldoende beargumenteerd waarom u geen vrouwelijk dieren kunt gebruiken. Of u wijzigt uw opzet of u zet uw argumentatie krachtiger uiteen.
- Bijlage 1, pagina 4, Onderbouwing aantallen dieren: Belangrijk is om aan te geven hoeveel dieren u nodig heeft om uw onderzoeksvraag te beantwoorden; u kunt het aantal dieren niet relateren aan de hoeveel tijd die u heeft voor het uitvoeren van uw onderzoek (2 jaar).
- Bijlage 1, algemeen: De DEC verzoekt u waar nodig de juiste nomenclatuur te gebruiken voor wat betreft de species en stammen.
- Datum antwoord: 04-11-2015
- Strekking van de antwoorden:
- Bijlage 1, punt B: Het type diersoort dat zal worden gebruikt in het allergisch astma model is de muis, de BALB/c By JICo stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De BALB/c muis die wij gebruiken is gevoelig voor de inductie van allergische astma (Hammad et al., Journal of Experimental Medicine, 2010; Verheijden et al., 2015, Respiratory Research). Dit model is gevalideerd in mannelijke muizen. We kunnen geen combinatie van mannelijke en vrouwelijke muizen gebruiken omdat dit zal leiden tot een grotere spreiding waardoor er meer dieren nodig zijn om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelgroepen. Tevens hebben wij in een eerdere studie aangetoond dat onze belangrijkste parameter (luchtwegweerstand) geen verschillen oplevert in vrouwelijke muizen en wel in mannelijke muizen (zie figuur bijlage). Bovengenoemde bevindingen en onze ervaringen binnen onze afdeling (validatie model in mannen en bijbehorende poweranalyses) liggen ten grondslag aan de keuze voor mannelijke muizen.

Luchtwegweersand

pbs VROUW

HDM VROUW

Budesonide VROUW

pbs MAN

HDM MAN

Budesonide MAN

- Bijlage 1, pagina 4, Onderbouwing aantallen dieren: Dit is aangepast in: 12 studies x 63 muizen per studie = 756 muizen voor dit type experiment
- Bijlage 1, algemeen: Is aangepast.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

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

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Allergisch astma is een steeds meer voorkomende chronische aandoening van de luchtwegen die grote invloed kan hebben op het dagelijks leven van patiënten. Tot op heden kan deze aandoening slechts symptomatisch behandeld worden met luchtwegverwijders en ontstekingsremmers, waarbij met name de ontstekingsremmers verschillende bijwerkingen hebben. Er zijn aanwijzingen dat probiotica dankzij hun immuunmodulerende werking een gunstig effect kunnen hebben op belangrijke symptomen van astma. De aanvrager wil met behulp van het voorliggende project nader onderzoeken óf en op welke wijze probiotica de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de symptomen kunnen verminderen. Het project zal fundamentele kennis opleveren over de onderliggende mechanismen van allergisch astma en de immuunmodulerende effecten van verschillende probiotica. Daarmee kan het project op de lange termijn bijdragen aan de ontwikkeling van probiotische voedingssupplementen ter preventieve en/of behandeling van allergisch astma. Het belang van de doelstelling schat de DEC daarom in als substantieel.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In dit project worden de effecten van verschillende probiotica in een huisstofmijt-geïnduceerd model voor allergisch astma onderzocht (bijlage 1). De keuze voor de te testen probiotica is gebaseerd op resultaten uit eerder *in vitro* en *in vivo* onderzoek. In de *in vivo* studies hadden de probiotica een gunstig effect op ófwel de luchtwegweerstand ófwel de ontsteking van de luchtwegen. Om te onderzoeken of de geselecteerde probiotica ook een additieve werking kunnen hebben – zowel op de luchtwegweerstand als op de mate van ontsteking – worden de probiotica in dit project op zichzelf staand en gecombineerd toegediend. Ook zullen zij zowel in een preventieve als in een curatieve setting onderzocht worden. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
 - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
 - ☐ Gefokt voor dierproeven (11)
 - ☐ Zwerfdieren (10h)
 - ☐ Hergebruik (1e lid 2)
 - ☐ Huisvesting en verzorging
 - ☐ Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. In bijlage 1 zullen alle dieren van alle experimentele groepen matig ongerief ondervinden, omdat ze herhaaldelijk onder anesthesie gebracht worden (voor sensitisatie en challenge met PBS of huisstofmijt) teneinde allergisch astma te induceren. Toediening van probiotica door middel van orale gavage veroorzaakt licht ongerief.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De interacties tussen verschillende weefsels en celtypen die een rol spelen bij allergisch astma – en de effecten van een dieetinterventie hierop – zijn dusdanig complex, dat deze niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden. In verband met de opzet van het onderzoek (inductie van allergisch astma om preventieve effecten te kunnen beoordelen) en de aard van de benodigde gegevens (onder andere analyse van cellulaire en humorale parameters in verschillende organen) is het niet mogelijk om het onderzoek uit te voeren in mensen. *In vivo* experimenten met proefdieren zijn dus noodzakelijk.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Met behulp van gegevens uit voorgaande studies (onder andere uitgevoerd ter validatie van het beschreven muismodel) worden powerberekeningen uitgevoerd, zodat het optimale aantal dieren per groep vooraf bepaald kan worden. Om onnodig proefdiergebruik te voorkomen worden alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controlegroepen meegenomen in het onderzoek.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De muis is gekozen als modeldier, omdat het immuunsysteem goed in kaart gebracht is en veel overeenkomsten vertoont met het immuunsysteem van de mens. Bovendien zijn veel methoden en producten voorhanden waarmee men het functioneren van het immuunsysteem kan onderzoeken. De onderzoeksgroep maakt gebruik van een huisstofmijt-geïnduceerd model voor allergisch astma. Dit model heeft ten opzichte van andere astmamodellen in muizen het voordeel, dat voor de sensitisatie geen ovalbumine in combinatie met een adjuvans toegepast wordt, maar een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de mens. De twee – van elkaar onafhankelijke – uitleesparameters 'luchtwegweerstand' en 'ontsteking' worden ook in humane astmapatiënten als zodanig gehanteerd. In dit project worden alleen mannelijk muizen gebruikt, omdat het allergisch astmamodel door de onderzoeksgroep in mannelijke muizen gevalideerd is. Daarnaast werd in een eerdere studie vastgesteld dat voor de parameter 'luchtwegweerstand' alleen in mannelijke muizen duidelijke verschillen waargenomen konden worden na interventie (zie pagina 7 van dit document). Daarnaast leidt het gebruik van één geslacht tot minder variatie tussen dieren, waardoor minder proefdieren nodig zijn voor het verkrijgen van statistisch significante resultaten. In een later stadium zal een vergelijking van resultaten verkregen in mannetjes versus vrouwtjes van toegevoegde waarde zijn voor de translatie naar de mens. Om ongerief ten gevolge van stress tot een minimum te beperken worden behandelingen zo kort en

efficiënt mogelijk uitgevoerd. Ongerief ten gevolge van het herhaaldelijk bijkomen uit anesthesie is niet te voorkomen. De muizen zullen na de sensitisatie en de challenge geen symptomen van allergisch astma ondervinden.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling – onderzoeken óf en op welke wijze probiotica de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de symptomen kunnen verminderen – substantieel is. De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, onder andere omdat het beschreven muismodel voor wat betreft het allergeen en de symptomen en bijbehorende uitleesparameters een goede benadering is van de situatie in de mens. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren in mensen, en er zijn evenmin volwaardige *in silico* of *in vitro* alternatieven beschikbaar. Er is voldaan aan de vereisten van vermindering en verfijning. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Dierexperimentencommissie Utrecht



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD108002015355

Bijlagen

2

Datum 18 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015355. 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: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

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 februari 2016
Geplande einddatum: 1 februari 2018
Titel project: Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma
Titel niet-technische samenvatting: Effect van gezondheidsbevorderende bacteriën in een muismodel voor allergische astma
Naam DEC: DEC Urecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Utrecht
Datum: 18 december 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015355

Bijlagen

2

Datum 18 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 18 december 2015

Vervaldatum: 17 januari 2016

Factuurnummer: 15700355

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015355	€ 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT

Universiteit Utrecht

**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
AVD108002015355

Uw referentie

Bijlagen

Datum 15 januari 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 18 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma met aanvraagnummer AVD108002015355. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

U geeft in de aanvraag aan dat er een figuur is bijgeleverd waarin staat beargumenteerd wat het verschil in gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren is. Wij kunnen deze niet vinden in onze stukken. Kunt u dit figuur nogmaals sturen?

U beschrijft dat onder terminale verdoving de luchtwegweerstand gemeten wordt. Hoe u dit doet wordt niet beschreven. Wij willen deze beschrijving wel graag terugzien. Dit hebben wij nodig om de haalbaarheid van het onderzoek navolgbaar te maken en het maakt het beeld compleet van de handelingen aan de dieren waardoor wij kunnen oordelen of inderdaad mannelijke dieren te prefereren zijn. Kunt u een beschrijving geven van de wijze waarop u de luchtweerstand meet?

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum

15 januari 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015355

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. 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.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | | |
|----------------|--|------------|--|
| Naam aanvrager | | | |
| Postcode | | Huisnummer | |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | | | |
|----------------|--|--|--|
| Aanvraagnummer | | | |
|----------------|--|--|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- | | |
|--------------------------|--|
| ☐ | |
| ☐ | |
| ☐ | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- | | | | |
|--------------|---|---|----|
| Naam | | | |
| Datum | - | - | 20 |
| Handtekening | | | |

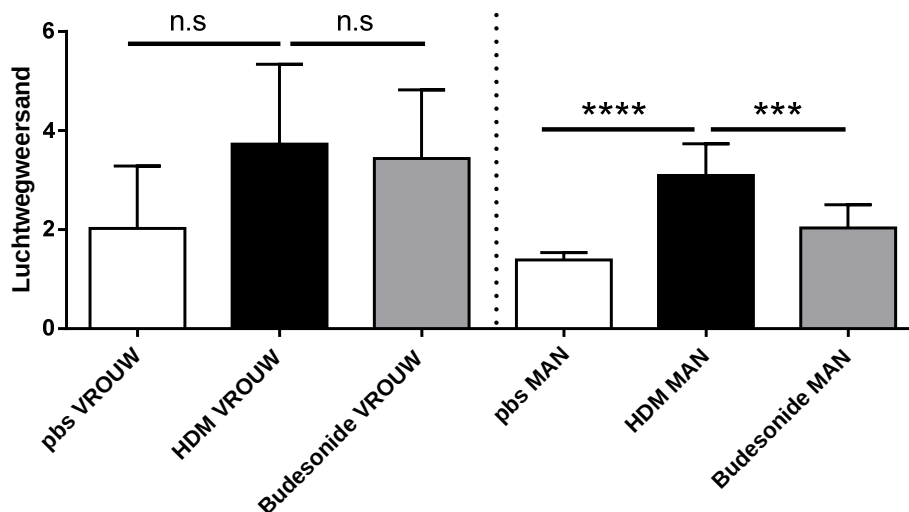
Geachte leden van de CCD,

Vriendelijk dank voor de beoordeling van projectaanvraag AVD108002015355 met als titel: Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma.

U vraagt toelichting op een tweetal punten. Hieronder zijn deze vragen puntsgewijs beantwoord.

1) Bijgaand figuur 1 waarin het verschil is aangegeven tussen vrouwelijke en mannelijke muizen in het huisstofmijt (HDM)-allergische model.

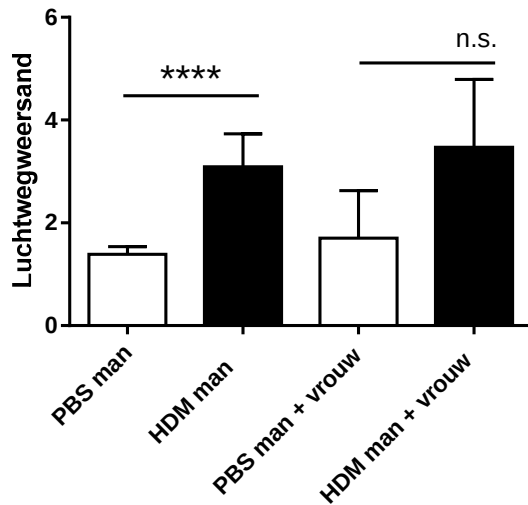
Figuur 1



In figuur 1 is zichtbaar dat er alleen een significant verschil is in de belangrijkste parameter, luchtwegweerstand, in mannen en niet in vrouwen. Dit geldt voor niet allergisch (PBS) versus allergische (HDM) dieren en voor allergische (HDM) dieren versus HDM dieren die behandeld zijn met budesonide. **De significante toename in luchtwegweerstand in HDM allergische mannen** is de basis om mannen te gebruiken voor onze experimenten.

Als aanvullende informatie het volgende: Bij de statistische analyse van **man + vrouw** (n=18) versus **man** (n=9) geldt dat er geen significant verschil is luchtwegweerstand tussen niet allergische dieren (PBS) en allergische dieren (HDM). Zie bijgevoegde figuur 2. Dit geeft aan dat het gemend gebruik van geslachten niet mogelijk is in onze proefopzet.

Figuur 2



2) De primaire parameter luchtwegweerstand wordt op de volgende manier gemeten:

Muizen worden door middel van een intraperitoneale injectie onder anesthesie gebracht, waarna ze beademd worden. Om te voorkomen dat de lichaamstemperatuur van de muizen te laag wordt, liggen de muizen in een verwarmde box waardoor de lichaamstemperatuur 37C blijft. Om de luchtweerstand te meten wordt er een canule geplaatst in de trachea van de muis. Oplopende concentraties metacholine(acetyl- β -methyl-choline chloride, 0-25mg/mL) worden toegediend door middel van aerosol gegenereerd in een vernevelaar (EMKA Technologies, Paris, France). Na iedere verneveling wordt de luchtwegweerstand gemeten. Na de laatste meting worden de dieren gedood voor verdere sectie.

Hopende u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]



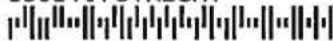
Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



Centrale Commissie

Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD108002015355

01 FEB 2016

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 18 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma" met aanvraagnummer AVD108002015355. 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 "Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 februari 2016 tot en met 1 februari 2018.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Urecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 december 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. In aanvulling daarop worden algemene voorwaarden toegevoegd, met het oog op art 10a1 van de Wod. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

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 nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

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

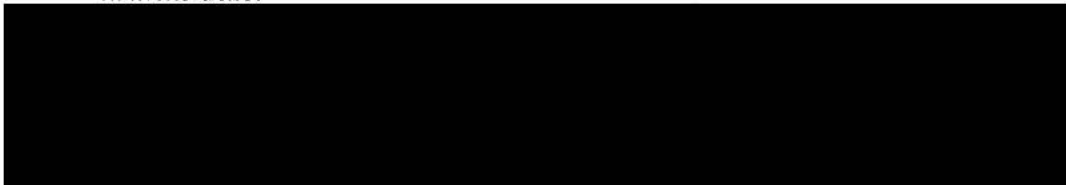
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



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 Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2016 tot en met 1 februari 2018, voor het project "Effecten van probiotica in een muismodel voor allergische astma" met aanvraagnummer AVD108002015355, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeks- en onderwijsmedewerker.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 december 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per brief op 18 december 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 18 december 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 december 2015, ontvangen op 18 december 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Proef 1: Huisstofmijt geïnduceerd model voor allergische astma	Muizen (Mus musculus) / BALB/c muis, mannelijke dieren	756	Matig / moderat e	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de Ivd te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.858.036
2. Titel van het project : "Effecten van probiotica-stammen in een muismodel voor allergische astma"
3. Titel van de NTS : Het effect van gezondheidsbevorderende bacteriën op allergische astma

4. Type aanvraag:

- ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
- ☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht

Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247

Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ☒ ontvangen door DEC: 10-09-2015
- ☐ aanvraag compleet:
- ☒ in vergadering besproken: 30-09-2015 en 21-10-2015
- ☒ anderszins behandeld: per mail: 04-11-2015
- ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 05-10-2015 tot 09-10-2015
23-10-2015 tot 04-11-2015
- ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- ☐ aanpassing aanvraag:
- ☒ advies aan CCD: 17-12-2015

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: 05-10-2015
- Strekking van de vragen:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: De DEC adviseert u om aan de eerste zin toe te voegen: 'In dit project willen we ... of ze allergie kunnen verminderen of voorkomen...'
- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Tevens adviseert de DEC u om de laatste zin te formuleren als volgt: '... die effect heeft op zowel de mate van benauwdheid als ook op de mate van ontsteking.' Dat geeft beter weer dat het juist om de combinatie gaat.
- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: De DEC is van mening dat de toelichting hier wat summier is en verzoekt u ook in te gaan op ongerief dat voortkomt uit benauwdheid, anesthesie, longfunctiemetingen, etc.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Hetgeen al bekend is over effecten van probiotica op luchtweg allergie uit de literatuur en uit eigen onderzoek is buitengewoon summier opgeschreven. Het is de DEC niet duidelijk wat er nog niet bekend is c.q. wat dit onderzoek toevoegt aan hetgeen al bekend is. De DEC verzoekt u deze informatie alsnog op te nemen in het projectvoorstel.
- 3.1 Achtergrond: De DEC wil graag inzage in de te testen stammen. Het is voor de DEC nu niet mogelijk om een goede afweging te maken. Indien de probiotica stammen die u gebruikt geheim zijn vragen wij u deze voor te leggen aan een door de DEC te vragen expert op dit gebied. De expert zal de DEC vervolgens adviseren zonder de geheime informatie met de DEC te delen.
- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u de termen inflammatie en reactiviteit beter te definiëren en aan te geven wat het verband c.q. het verschil is. Het lijkt erop dat u op zoek bent naar probiotica die beide mechanismen beïnvloeden, alleen of in combinatie. Dit moet helder in de hypothese worden opgenomen.
- 3.2 Doel: U dient zich hier te beperken tot het doel. Tekst over de reeds behaalde resultaten moet naar 3.1 achtergrond, evenals de literatuurgegevens.
- 3.2 Doel: Het doel graag duidelijker beschrijven.
- 3.2 Doel: U gebruikt hier de term 'preklinisch', wat verwarrend is want dit lijkt hier niet aan de orde. Graag verwijderen.
- 3.2 Doel/3.4 Onderzoeksstrategie: U beschrijft indirect wat de hypothese is, namelijk dat de door u gekozen (combinatie van) probiotica effectief zal zijn, omdat deze effect hebben op zowel luchtwegreactiviteit als ook op ontsteking van de longen. Dat zou meer expliciet en uitgebreid bij het doel (en eigenlijk ook al in de achtergrond) opgenomen moeten worden. Graag alsnog doen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC mist hier de criteria waarbij u het besluit neemt om in muismodel voor allergische astma te gaan onderzoeken. Met andere woorden: de inclusiecriteria ontbreken. Graag alsnog opnemen.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De onderbouwing voor de benodigde aantallen dieren is onvoldoende. De N=9 graag nader onderbouwen.
- B. De dieren: In twee jaar worden 12 proeven gedaan, elk met 63 dieren. Betekent dat 36 verschillende probiotica? Graag verhelderen.
- B. De dieren: De DEC verzoekt u het gebruik van uitsluitend mannelijke dieren beter te motiveren.
- B. De dieren: Op p.3, onderste alinea staat: 'Naar verwachting zullen we probiotische stammen los van elkaar en in combinatie van elkaar testen (preventie en behandelstudie).' Deze zin is wat verwarrend. Of iets een preventie- of behandelstudie is wordt bepaald door het tijdstip van interventie, en niet door de in te zetten probiotica. De zin daarom graag wijzigen.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Onder verfijning staat de zin 'Het eventuele ongerief wat kan optreden kunnen we zoveel mogelijk beperken, maar niet voorkomen'. Hier graag ook aangeven hoe u het ongerief zoveel mogelijk gaat beperken.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Hier geeft u aan dat u alleen stress voorziet als eventuele andere vorm van welzijnsaantasting. De DEC vraagt zich af of u niet ook benauwdheid verwacht?
- J. Humane eindpunten: De humane eindpunten zijn niet ingevuld. Graag alsnog doen.
- K. Classificatie van ongerief: U geeft aan dat alle dieren matig ongerief ervaren. De DEC kan zich voorstellen dat de dieren uit de controlegroep (budesonide-behandeling) door 4x extra anesthesie uiteindelijk ook uitkomen op matig ongerief, maar ziet echter wel graag dat het cumulatieve ongerief voor de controle en experimentele groepen afzonderlijk en duidelijker opgeschreven wordt.

Algemeen

- De DEC adviseert u contact op te nemen met de IvD voor een betere afstemming van, met name, bijlage 1. Daarnaast wordt in het projectvoorstel probioticum (enkelvoud) en probiotica (meervoud) door elkaar gebruikt. Graag corrigeren.
- Datum antwoord: 09-10-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Deze zin is aangepast in de niet technische samenvatting.
- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Deze zin is aangepast in de niet technische samenvatting.
- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren: De verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zijn: Het toedienen van huisstofmijt, PBS en luchtwegverwijder. Dit vindt plaats onder anesthesie, hier kunnen de dieren ongerief van ondervinden. Tevens zullen de muizen licht ongerief ervaren tijdens het vastpakken en

tijdens het toedienen van de probiotica. Muizen hebben geen last van benauwdheid na challenge met huisstofmijt. Alleen tijdens de luchtwegfunctiemeting wordt benauwdheid gemeten, omdat er een prikkel wordt gegeven waardoor de spieren in de luchtwegen samentrekken, maar hierbij zijn de dieren onder anesthesie. De hoeveelheid behandelingen kan wel stress veroorzaken. De dieren ondervinden geen blijvende effecten van een allergische reactie.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De effecten van probiotica op astma waren inderdaad summier opgeschreven. Daarom hebben we geprobeerd om deze uitgebreider te omschrijven inclusief de toevoegende waarde van dit onderzoek. Uit literatuuronderzoek is gebleken dat *Lactobacillus* stammen (vb. *Helveticus*, *Casei*, *Rhamnosus* etc.) en *Bifidobacterium* stammen (*Breve*, *Bifidum* etc.) een effect kunnen hebben op luchtwegweerstand of ontsteking van de longen (Kim et al., *J. Appl. Microbiol.* 2013; MacSharry et al., *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2012; Jang et al., *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2012). In al deze experimenten is gebruik gemaakt van een ovalbumine geïnduceerd astma model, waarbij gebruikt wordt gemaakt van een adjuvans. Bij het huisstofmijtmodel daarentegen wordt er gebruik gemaakt van een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de humane situatie. Tevens is in deze studies de mate van benauwdheid gemeten met behulp van de Penh meting. Deze meting staat onder discussie omdat hiermee niet de longweerstand wordt gemeten, maar veranderingen in de hoge luchtwegen (met name de neus) (Verheijden et al., *Front. In Pharm.*, 2014). In dit experiment wordt gebruik gemaakt van de longweerstandmeting waarbij wel de mate van benauwdheid gemeten wordt. Door in dit experiment nieuwe losse probiotica stammen of combinaties hiervan te testen willen we zowel de mate van benauwdheid als ook de mate van ontsteking remmen. Mogelijk zorgen combinatie van probiotica stammen voor een additieve werking op deze parameters.
- 3.1 Achtergrond: De te testen stammen zijn niet geheim. In dit project wordt gebruik gemaakt van verschillende *Lactobacillus* stammen (vb. *Helveticus*, *Casei*, *Rhamnosus* etc.) en *Bifidobacterium* stammen (*Breve*, *Bifidum*, *Longum* etc.).
- 3.1 Achtergrond: We begrijpen dat de termen inflammatie en reactiviteit niet helemaal duidelijk zijn en hebben deze daarom aangepast in ontsteking en luchtwegweerstand in de gehele aanvraag. Na sensitisatie en challenge laten de muizen manifestaties van allergische astma zien zoals die vergelijkbaar zijn met de symptomen in patiënten. Er ontstaat een inflammatie (ontsteking) van de longen met als belangrijkste ontstekingscel de eosinofiele granulocyt. Deze cellen worden geteld na spoeling van de longen. Na een aerosol met metacholine wordt de weerstand van de longen gemeten (mate van benauwdheid). Verscheidene cytokines (zoals IL-4, IL-5 en IL-13) nemen toe in de longspoeling net zoals bij astmapatiënten het geval is (Verheijden et al., *Respir Res*, 2015; Kool et al., *Immunity*, 2011; Holgate, *Nat Med*, 2012). Met behulp van dit project willen we door middel van verschillende (combinaties) probiotica stammen proberen om zowel de luchtwegweerstand als ook de mate van ontsteking te remmen. Beide mechanismen zijn belangrijke parameters in

astmapatiënten. Tevens is de mate van ontsteking niet gerelateerd aan de mate van benauwdheid, wat dus inhoudt dat beide mechanisme los staan van elkaar. Verschillende klinische trials zijn uitgevoerd met antilichamen die gericht zijn tegen IL-5 (een belangrijke cytokine in astma). Ook hieruit is gebleken dat ze alleen effect hebben op de ontsteking en niet op de luchtwegweerstand (Leckie et al., Lancet, 2000; Flood-Page et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2007). Daarom is het belangrijk om zowel luchtwegweerstand als ook de ontsteking te remmen.

- 3.2 Doel: Is verplaatst naar 3.1 achtergrond.
- 3.2 Doel: Het hoofddoel van dit project is het onderzoeken of losse probiotica stammen of combinaties hiervan astmasymptomen kunnen onderdrukken of verminderen, dit in preventie studies en behandel studies. In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie), waarna de behandeling met probiotica start. Door gebruik te maken van losse probiotica of combinaties hiervan willen we zowel de luchtwegweerstand (mate van benauwdheid) als de mate van ontsteking remmen in huisstofmijt allergische muizen. Combinaties van probiotica stammen worden gebruikt om te onderzoeken of er hier een additieve werking van de probiotica stammen ontstaat.
- 3.2 Doel: Is aangepast.
- 3.2 Doel/3.4 Onderzoeksstrategie: De hypothese is in zowel het doel en de achtergrond explicieter beschreven.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Het is onderzoeker niet helemaal duidelijk wat de DEC hier bedoelt. We gaan ervan uit dat de DEC vraagt waarom we een muismodel gebruiken voor allergisch astma. Het is nog niet mogelijk om het proces van allergische astma volledig te bootsen door middel van alternatieve testen. Het proces is daarvoor te complex. In de afgelopen jaren zijn er diersmodellen ontwikkeld waarin allergie inductie voor astma bestudeerd kan worden (Kool et al., Immunity, 2011; Hammad et al., J Exp Med, 2010). De muizen worden allergisch gemaakt met behulp van huisstofmijt, omdat de muizen geen spontane (meetbare) allergie kunnen ontwikkelen. Na sensitisatie en challenge laten de muizen echter veel, al dan niet alle manifestaties van astma zien zoals we die ook in patiënten zien. Er ontwikkelen zich ontstekingscellen (met name eosinofiele granulocyten), allergeen-specifieke T cellen, en er kan benauwdheid gemeten worden na aerosol met metacholine (Verheijden et al., Respir Res, 2015; Kool et al., Immunity, 2011). Hierdoor is dit model uitermate geschikt om te kijken naar preventie en behandel methodes in allergische astma. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de probiotica kan alleen in de muis doordat het gebruik van weefsels noodzakelijk is.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Naar analogie van eerdere aanwijzingen van de statistiek afdeling hebben we een poweranalyse uitgevoerd op voor dit onderzoek constante en belangrijke parameters. De powerberekening is opgenomen in de aanvraag bij punt A van bijlage 1.

- B. De dieren: Bij elk experiment zijn standaard de volgende groepen inbegrepen: 1) positieve controle, 2) negatieve controle, 3) Budesonide groep, en 4) referentie probiotica groep. Daarnaast worden er maximaal 6 verschillende stammen getest, los van elkaar of in combinaties van 2 of 3 stammen. Enkele stammen die gebruikt worden zijn Lactobacillus Helveticus, Lactobacillus Casei, Bifidobacterium Bifidum, Bifidobacterium Longum etc.

Voorbeelden van studies:

1	3	1	1	2	2	1
2	4	3	4	3	4	2
1+2	3+4	1+3	1+4	2+3	2+4	3
						1+2+3

- B. De dieren: Wanneer in studies gebruik gemaakt wordt van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen zal dit leiden tot een grotere spreiding en zijn er meer dieren nodig om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelgroepen. Indien de DEC de voorkeur geeft aan vrouwelijk muizen, dan zal eerst een experiment uitgevoerd moeten worden om het model te valideren in vrouwelijke muizen. Deze vergelijkende studie brengt het gebruik van extra proefdieren met zich mee. Het belangrijkste argument voor de onderzoekers is dat de vergelijking tussen geslachten niet het doel is van deze studie. Voor translatie zal dit uiteindelijk in de toekomst wel relevant zijn, maar dit valt buiten de onderzoeksvraag. Bovengenoemde bevindingen en onze ervaringen binnen onze afdeling (validatie model in mannen en bijbehorende poweranalyses) liggen ten grondslag aan de keuze voor mannelijke muizen.
- B. De dieren: Deze zin is aangepast in: Naar verwachting zullen we probiotische stammen los van elkaar en in combinatie met elkaar testen in een preventie studie en behandel studie, met als controle behandeling: budesonide en een referentie probiotica (L. Rhamnosus). In het preventieve model start de behandeling met probiotica voor de sensitisatie (dus voor het eerste contact met huisstofmijt). In het behandelmodel zijn de dieren al een keer blootgesteld aan huisstofmijt (sensitisatie), waarna de behandeling met probiotica start.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Het ongerief wordt zo veel mogelijk beperkt door de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren door ervaren medewerkers.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Na sensitisatie en challenge vertonen de muizen geen benauwdheid. Alleen tijdens de luchtwegfunctiemeting wordt benauwdheid gemeten. Dit wordt dan geïnduceerd door een aerosol te geven met metacholine. Hierdoor trekken de spieren van de luchtwegen samen, omdat de dieren hierbij onder anesthesie zijn zullen ze hier geen ongerief van ondervinden.
- J. Humane eindpunten: De humane eindpunten zijn ingevuld onder punt J. Bij dit experiment worden geen omstandigheden verwacht waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd worden, omdat de muizen geen symptomen van allergie ondervinden na sensitisatie en challenge. Tijdens de dagelijkse controle door de diervverzorgers en de reguliere controles door de projectleden zullen acties ondernomen worden wanneer hoog uitzonderlijke abnormaliteiten zoals abnormaal gedrag, beweging, ernstig gewichtsverlies of wondjes waargenomen worden. In dit geval zal er actie ondernomen worden door eventueel het dier individueel te huisvesten en/of er wordt contact opgenomen met de diervverzorgers

en/of de proefdierdeskundige om te kijken of het dier uit het experiment gehaald moet worden om onnodig ongerief te voorkomen.

- K. Classificatie van ongerief: Het ongerief is nu voor alle groepen afzonderlijk beschreven.

Algemeen

- Dit is aangepast.
- Datum: 23-10-2015
- Strekking van de vragen:
 - Bijlage 1, punt B: U heeft hier onvoldoende beargumenteerd waarom u geen vrouwelijk dieren kunt gebruiken. Of u wijzigt uw opzet of u zet uw argumentatie krachtiger uiteen.
 - Bijlage 1, pagina 4, Onderbouwing aantallen dieren: Belangrijk is om aan te geven hoeveel dieren u nodig heeft om uw onderzoeksvraag te beantwoorden; u kunt het aantal dieren niet relateren aan de hoeveel tijd die u heeft voor het uitvoeren van uw onderzoek (2 jaar).
 - Bijlage 1, algemeen: De DEC verzoekt u waar nodig de juiste nomenclatuur te gebruiken voor wat betreft de species en stammen.
- Datum antwoord: 04-11-2015
- Strekking van de antwoorden:
 - Bijlage 1, punt B: Het type diersoort dat zal worden gebruikt in het allergisch astma model is de muis, de BALB/c By JcCo stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De BALB/c muis die wij gebruiken is gevoelig voor de inductie van allergische astma (Hammad et al., Journal of Experimental Medicine, 2010; Verheijden et al., 2015, Respiratory Research). Dit model is gevalideerd in mannelijke muizen. We kunnen geen combinatie van mannelijke en vrouwelijke muizen gebruiken omdat dit zal leiden tot een grotere spreiding waardoor er meer dieren nodig zijn om statistisch significante verschillen aan te tonen tussen de verschillende behandelgroepen. Tevens hebben wij in een eerdere studie aangetoond dat onze belangrijkste parameter (luchtwegweerstand) geen verschillen oplevert in vrouwelijke muizen en wel in mannelijke muizen (zie figuur bijlage). Bovengenoemde bevindingen en onze ervaringen binnen onze afdeling (validatie model in mannen en bijbehorende poweranalyses) liggen ten grondslag aan de keuze voor mannelijke muizen.

Luchtwegweersand

Pbs VROUW

HDM VROUW

Budesonide VROUW

Pbs MAN

HDM MAN

Budesonide MAN

- Bijlage 1, pagina 4, Onderbouwing aantallen dieren: Dit is aangepast in: 12 studies x 63 muizen per studie = 756 muizen voor dit type experiment
- Bijlage 1, algemeen: Is aangepast.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

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

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Allergisch astma is een steeds meer voorkomende chronische aandoening van de luchtwegen die grote invloed kan hebben op het dagelijks leven van patiënten. Tot op heden kan deze aandoening slechts symptomatisch behandeld worden met luchtwegverwijders en ontstekingsremmers, waarbij met name de ontstekingsremmers verschillende bijwerkingen hebben. Er zijn aanwijzingen dat probiotica dankzij hun immuunmodulerende werking een gunstig effect kunnen hebben op belangrijke symptomen van astma. De aanvrager wil met behulp van het voorliggende project nader onderzoeken óf en op welke wijze probiotica de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de symptomen kunnen verminderen. Het project zal fundamentele kennis opleveren over de onderliggende mechanismen van allergisch astma en de immuunmodulerende effecten van verschillende probiotica. Daarmee kan het project op de lange termijn bijdragen aan de ontwikkeling van probiotische voedingssupplementen ter preventieve en/of behandeling van allergisch astma. Het belang van de doelstelling schat de DEC daarom in als substantieel.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In dit project worden de effecten van verschillende probiotica in een huisstofmijt-geïnduceerd model voor allergisch astma onderzocht (bijlage 1). De keuze voor de te testen probiotica is gebaseerd op resultaten uit eerder *in vitro* en *in vivo* onderzoek. In de *in vivo* studies hadden de probiotica een gunstig effect op ófwel de luchtwegweerstand ófwel de ontsteking van de luchtwegen. Om te onderzoeken of de geselecteerde probiotica ook een additieve werking kunnen hebben – zowel op de luchtwegweerstand als op de mate van ontsteking – worden de probiotica in dit project op zichzelf staand en gecombineerd toegediend. Ook zullen zij zowel in een preventieve als in een curatieve setting onderzocht worden. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
 - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
 - ☐ Gefokt voor dierproeven (11)
 - ☐ Zwerfdieren (10h)
 - ☐ Hergebruik (1e lid 2)
 - ☐ Huisvesting en verzorging
 - ☐ Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. In bijlage 1 zullen alle dieren van alle experimentele groepen matig ongerief ondervinden, omdat ze herhaaldelijk onder anesthesie gebracht worden (voor sensitisatie en challenge met PBS of huisstofmijt) teneinde allergisch astma te induceren. Toediening van probiotica door middel van orale gavage veroorzaakt licht ongerief.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De interacties tussen verschillende weefsels en celtypen die een rol spelen bij allergisch astma – en de effecten van een dieetinterventie hierop – zijn dusdanig complex, dat deze niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden. In verband met de opzet van het onderzoek (inductie van allergisch astma om preventieve effecten te kunnen beoordelen) en de aard van de benodigde gegevens (onder andere analyse van cellulaire en humorale parameters in verschillende organen) is het niet mogelijk om het onderzoek uit te voeren in mensen. *In vivo* experimenten met proefdieren zijn dus noodzakelijk.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Met behulp van gegevens uit voorgaande studies (onder andere uitgevoerd ter validatie van het beschreven muismodel) worden powerberekeningen uitgevoerd, zodat het optimale aantal dieren per groep vooraf bepaald kan worden. Om onnodig proefdiergebruik te voorkomen worden alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controlegroepen meegenomen in het onderzoek.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De muis is gekozen als modeldier, omdat het immuunsysteem goed in kaart gebracht is en veel overeenkomsten vertoont met het immuunsysteem van de mens. Bovendien zijn veel methoden en producten voorhanden waarmee men het functioneren van het immuunsysteem kan onderzoeken. De onderzoeksgroep maakt gebruik van een huisstofmijt-geïnduceerd model voor allergisch astma. Dit model heeft ten opzichte van andere astmamodellen in muizen het voordeel, dat voor de sensitisatie geen ovalbumine in combinatie met een adjuvans toegepast wordt, maar een allergeen dat gerelateerd is aan astma in de mens. De twee – van elkaar onafhankelijke – uitleesparameters 'luchtwegweerstand' en 'ontsteking' worden ook in humane astmapatiënten als zodanig gehanteerd. In dit project worden alleen mannelijke muizen gebruikt, omdat het allergisch astmamodel door de onderzoeksgroep in mannelijke muizen gevalideerd is. Daarnaast werd in een eerdere studie vastgesteld dat voor de parameter 'luchtwegweerstand' alleen in mannelijke muizen duidelijke verschillen waargenomen konden worden na interventie (zie pagina 7 van dit document). Daarnaast leidt het gebruik van één geslacht tot minder variatie tussen dieren, waardoor minder proefdieren nodig zijn voor het verkrijgen van statistisch significante resultaten. In een later stadium zal een vergelijking van resultaten verkregen in mannetjes versus vrouwtjes van toegevoegde waarde zijn voor de translatie naar de mens. Om ongerief ten gevolge van stress tot een minimum te beperken worden behandelingen zo kort en

efficiënt mogelijk uitgevoerd. Ongerief ten gevolge van het herhaaldelijk bijkomen uit anesthesie is niet te voorkomen. De muizen zullen na de sensitisatie en de challenge geen symptomen van allergisch astma ondervinden.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling – onderzoeken óf en op welke wijze probiotica de ontwikkeling van astma kunnen voorkomen en/of de symptomen kunnen verminderen – substantieel is. De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, onder andere omdat het beschreven muismodel voor wat betreft het allergeen en de symptomen en bijbehorende uitleesparameters een goede benadering is van de situatie in de mens. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren in mensen, en er zijn evenmin volwaardige *in silico* of *in vitro* alternatieven beschikbaar. Er is voldaan aan de vereisten van vermindering en verfijning. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Dierexperimentencommissie Utrecht

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 1 februari 2016 14:29
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: beschikking AVD108002015
Bijlagen: AVD108002015355 beschikking_getekend.pdf

Geachte lezer,

Bij deze sturen wij u de beschikking voor bovengenoemde aanvraag.
De beschikking is ook per post verstuurd.
Wij wensen u veel succes met het onderzoek.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven