

Inventaris Wob-verzoek W16-13S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016451</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud			x					
6	DEC-advies			x					
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Mail verzoek aanpassing 23-3-2016				x		x	x	
9	Projectvoorstel herzien			x					
10	Niet-technische samenvatting herzien	x							
11	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien			x					
12	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien			x					
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Mail terugkoppeling DEC 19-4-2016				x		x	x	



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

### Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	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.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     |  |
| Afdeling                    |  |
| Telefoonnummer              |  |
| E-mailadres                 |  |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* 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 *wijziging* 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 *melding* 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 4 . 2 0 1 6 |
| Einddatum  | 0 1 . 0 4 . 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Preventie en behandeling van gewrichtsschade na een bloeding
- 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 € 1.187,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Literatuurlijst. Bijlage beschrijving dierproeven (I) en fok met ongerief (II)

## 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

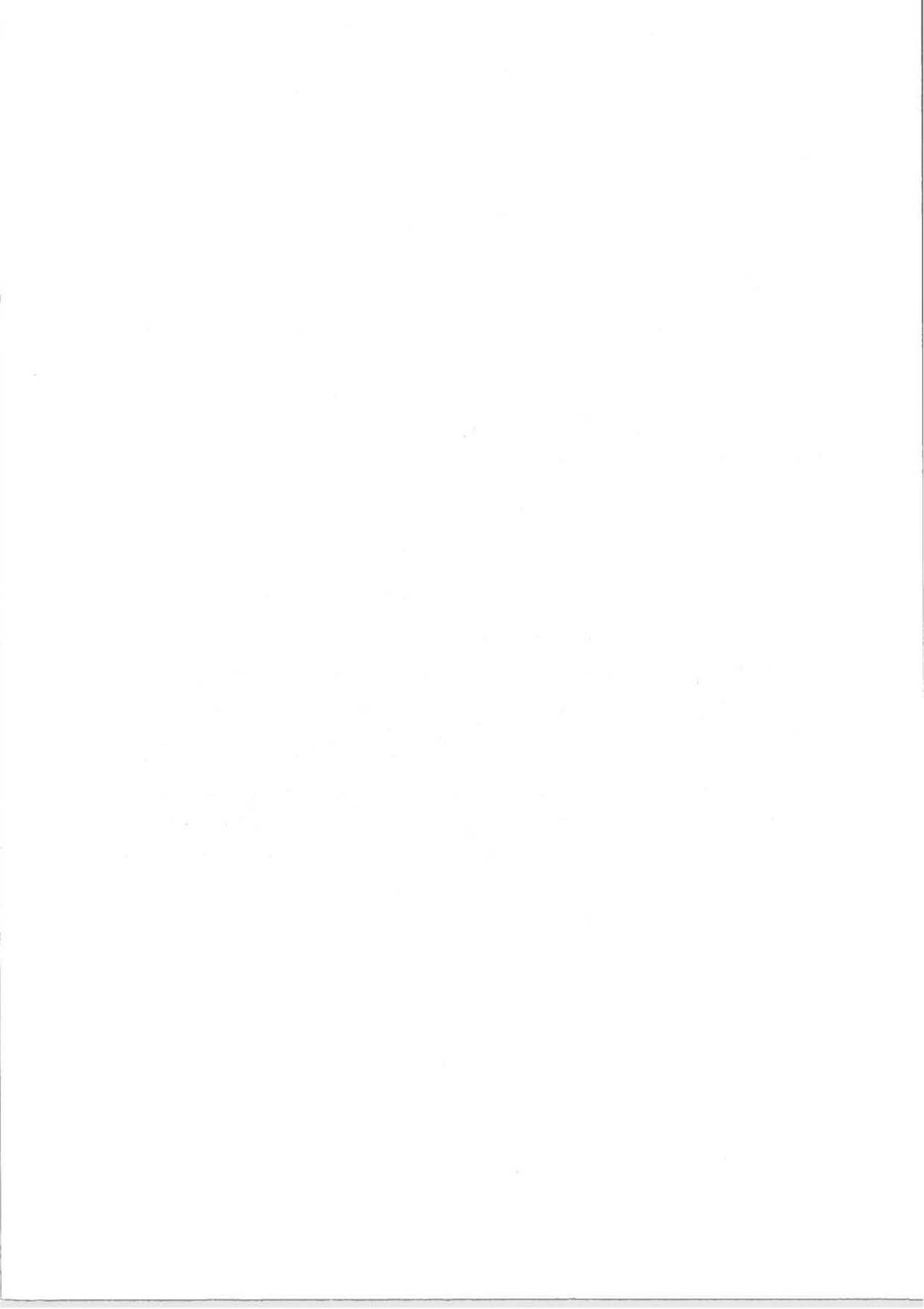
Plaats

Datum

Handtekening

Utrecht

23-02-2016





## 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](http://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.

Gewrichtsbloedingen kunnen ontstaan als gevolg van trauma [1] of operatie [2], maar worden ook gezien in het kader van artrose [3], pigmented villonodular synovitis [4] of ziekten met een verhoogde bloedingsneiging zoals hemofilie [5]. Ongeacht de oorzaak, veroorzaakt recidiverende hemartrose kraakbeenschade en chronische inflammatie van het synovium en resulteert uiteindelijk in bloed-geïnduceerde artropathie [6]. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat naast inflammatie onder andere ijzer, dat bij een bloeding intra-articulair vrijkomt uit erythrocyten, daarbij een cruciale rol speelt [7].

Hemofilie wordt beschouwd als de prototypische ziekte die model staat voor de pathobiologie van bloed-geïnduceerde artropathie [8]. Hemofilie is een erfelijke X-linked recessieve stollingsfactordeficiëntie van factor VIII (Hemofilie A) en IX (Hemofilie B) [9]. Patiënten met ernstige hemofilie (FVIII/IX < 1%) krijgen frequent spontane gewrichtsbloedingen, waarbij de knieën, ellebogen en enkels het vaakst zijn aangedaan [10]. Met stollingsfactorconcentraat kan het aantal gewrichtsbloedingen bij hemofiliepatiënten worden gereduceerd, maar niet geheel voorkomen worden [11]. Daarnaast is stollingsfactor-concentraat slechts in een beperkt aantal landen beschikbaar vanwege de hoge kosten. Wereldwijd heeft de meerderheid van de hemofiliepatiënten geen toegang tot deze behandeling. Verder ontwikkelt 1/3 van de hemofiliepatiënten antistoffen tegen het stollingsfactorconcentraat (remmers) [12]. Voor deze patiëntengroep is geactiveerd prothrombine complex concentraat of recombinant factor VIIa beschikbaar, maar deze behandeling is duur en minder effectief waardoor er evengoed herhaaldelijke gewrichtsbloedingen kunnen ontstaan [13]. Daarom zijn nieuwe vormen van therapie voor bloed-geïnduceerde gewrichtsschade noodzakelijk.

De afgelopen jaren is door onze groep kennis vergaard over de pathogenese van gewrichtsbloedingen en zijn de eerste stappen naar mogelijke nieuwe behandelingen bestudeerd. Een aantal voorbeelden hier van zijn:

- A) Deferasirox is een orale ijzerchelator, die voornamelijk via de faeces de excretie van ijzer bevordert [17]. Deferasirox wordt reeds gebruikt bij patiënten met ijzerstapelingsziekten. Gezien de centrale rol van ijzer bij het ontstaan van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade, zou deferasirox een aantrekkelijke behandeling kunnen zijn. In eerder onderzoek lijkt profylactisch gegeven deferasirox het kraakbeen te beschermen bij hemartrose geïnduceerd in hemofilie muizen [18].
- B) Van interleukine-1 $\beta$  (IL1b) is aangetoond dat het een cruciale factor is in de ontwikkeling van bloed-geïnduceerde kraakbeenschade *in vitro*. Het blokkeren van deze pro-inflammatoire cytokine met een monokonaal antilichaam beschermt het kraakbeen tegen schadelijke effecten bij blootstelling aan bloed [16]. Het remmen van de productie van IL1b zou dus ook *in vivo* een behandelingsoptie kunnen zijn.
- C) Het IL4-10 synerkine is een fusie-eiwit bestaande uit IL-4 en IL-10. Van IL-4 en IL-10 is bekend dat ze de productie van pro-inflammatoire cytokines die vrijkomen bij een gewrichtsbloeding, zoals IL-1 $\beta$ , IL-6 en TNF- $\alpha$ , remmen [14]. Een combinatie van IL-4 en IL-10 *in vitro* voorkomt gewrichtsschade na een geïnduceerde bloeding [15] en zou daarmee ook *in vivo* een behandelingsmodaliteit kunnen zijn.

Hoewel de benoemde opties hoopvol zijn, is verder onderzoek naar de verschillende interventies die gewrichtsschade na een bloeding kunnen voorkomen of reduceren nodig om de translatie naar humane kliniek te kunnen maken. Om de pathogenese beter te begrijpen en eventueel nieuwe behandeltarget te



ontdekken, is er meer kennis nodig over het effect van de interventies op (systemische) inflammatie en kraakbeenschade na een bloeding. Om dit verder te kunnen onderzoeken zijn er diverse experimenten nodig in een diermodel voor bloed-geïnduceerde gewrichtsschade, in zogenaamde hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J). Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor humane hemofilie.

### 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?

De doelstelling van dit onderzoeksproject is het verkrijgen van inzicht in de pathogenese van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Daarnaast wordt het effect onderzocht van verschillende interventies gericht op het voorkomen of behandelen van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Deze interventies zijn: ijzerchelatoren, IL1b-receptorantagonisten en IL4-10 synerkine. Translatie naar een betere behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade en het verminderen van de daarmee samenhangende morbiditeit in de kliniek staat hierbij voorop.

### 3.3 Belang

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

Ongeacht de oorzaak van de gewrichtsbloedingen, leidt bloed-geïnduceerde artropathie tot ernstige morbiditeit. Bij hemofiliepatiënten is het één van de meest voorkomende complicaties en heeft grote gevolgen. Patiënten ervaren chronische pijn, bewegingsbeperkingen, invaliditeit en een verminderde kwaliteit van leven, vaak al op een zeer jonge leeftijd (minder dan 30 jaar) [19]. Uiteindelijk is vaak orthopedisch ingrijpen noodzakelijk [20,21]. Chirurgische procedures worden echter bemoeilijkt door de verminderde hemostase en zijn bovendien erg kostbaar. Derhalve is het nodig om nieuwe behandelingen van bloed-geïnduceerde artropathie te onderzoeken.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

#### Algemene opzet

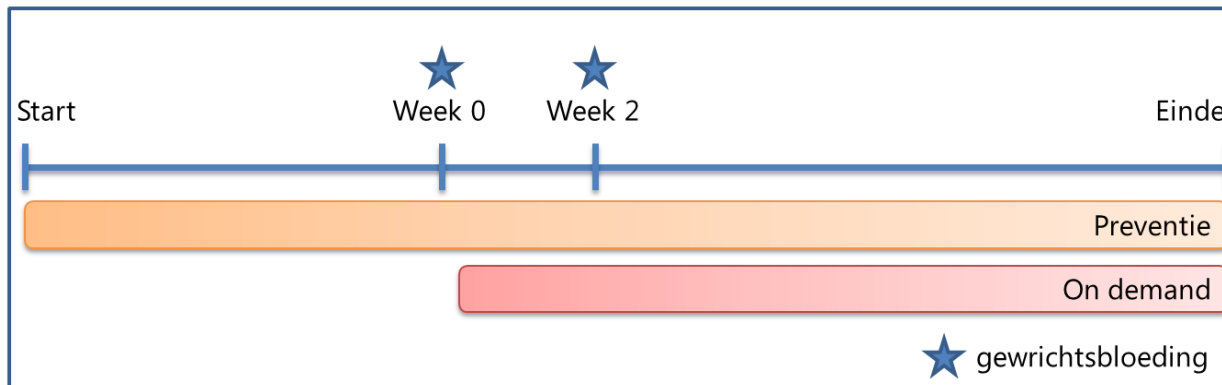
De verschillende interventies van dit project weerspiegelen verschillende mechanismen om in te grijpen in het proces van de bloed-geïnduceerde gewrichtsschade (zie figuur 2 bij 3.4.3). Per interventie zoals beschreven in 3.1 zullen een aantal experimenten worden opgezet. Bij die experimenten wordt de interventie ingezet als preventieve maatregel en bij succes als behandeling (*on demand*) getoetst. Hierbij zal er tevens een brede analyse naar de lokale en systemische effecten plaats vinden.

#### Model

Hemartrose wordt geïnduceerd in zogenaamde hemofilie muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J), naar het muismodel van Hakobyan [8]. Er is gekozen voor deze vorm van trauma gezien het relatief beperkte ongerief voor het dier en de opgedane ervaring binnen onze onderzoeksgroep. Hemofiliemuizen vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie. De hemofilie muizen, die drie tot vier maanden oud zijn, worden geanestheesd middels inhalatie anesthesie. Met een 30G naald wordt het kapsel van de rechter knie onder de patella gepuncteerd om een bloeding te induceren. De linker knie wordt niet aangedaan en geldt als een controle. Na twee weken wordt via dezelfde methode een tweede bloeding geïnduceerd.



In het geval dat de interventie preventief gegeven wordt, krijgen hemofiliemuizen de medicatie al *voor* de inductie van de gewrichtsbloeding. Eventueel wordt de interventie na de gewrichtsbloeding voor een bepaalde tijd voortgezet. In het geval dat de interventie als behandeling (*on demand*) wordt gegeven, wordt de interventie pas gestart *na* het induceren van de gewrichtsbloeding.



Figuur 1 – Tijdslijn experimenten Preventie en On demand

#### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameter is histologie post mortem, waarbij de mate van kraakbeenschade en inflammatie van het synovium vastgesteld worden. Secundaire uitkomstparameter is macroscopische inspectie, waarbij gekeken wordt naar de mate van zichtbare bloeding en gewrichtsdiameter. Tevens wordt bloed afgenomen middels een wangpunctie, waarbij verschillende inflammatoire parameters en biomarkers bepaald worden.

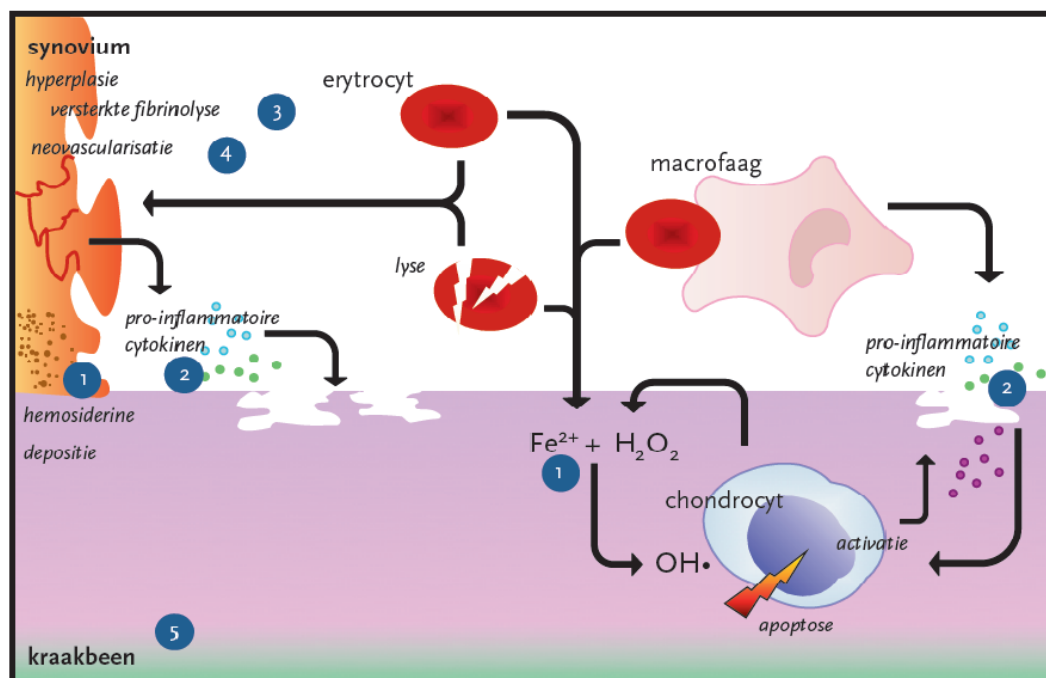
#### 3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

De verschillende onderdelen van het project:

- A) Interventie: ijzerchelator
  - Preventie (behandelen met ijzerchelator alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
  - On demand (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas ijzerchelator toegediend wordt)
- B) Interventie: IL1b-receptor antagonist
  - Preventie (behandelen met IL1b-receptor antagonist alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
  - On demand (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas IL1b-receptor antagonist toegediend wordt)
- C) Interventie: IL4-10 synerkine
  - Preventie (behandelen met IL4-10 synerkine alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
  - On demand (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas IL4-10 synerkine toegediend wordt)

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

De pathogenese van bloed-geïnduceerde artropathie is complex. Op verschillende niveaus zou op dit proces ingegrepen kunnen worden. In onderstaand figuur [22] staat de pathogenese van bloed-geïnduceerde artropathie beschreven met mogelijke aangrijpingspunten voor potentiële nieuwe therapie. Vertaald naar onze studie grijpt interventie A (ijzerchelator) aan op nummer 1 en interventie B en C (IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) remmen de pro-inflammatoire cytokines van nummer 2.

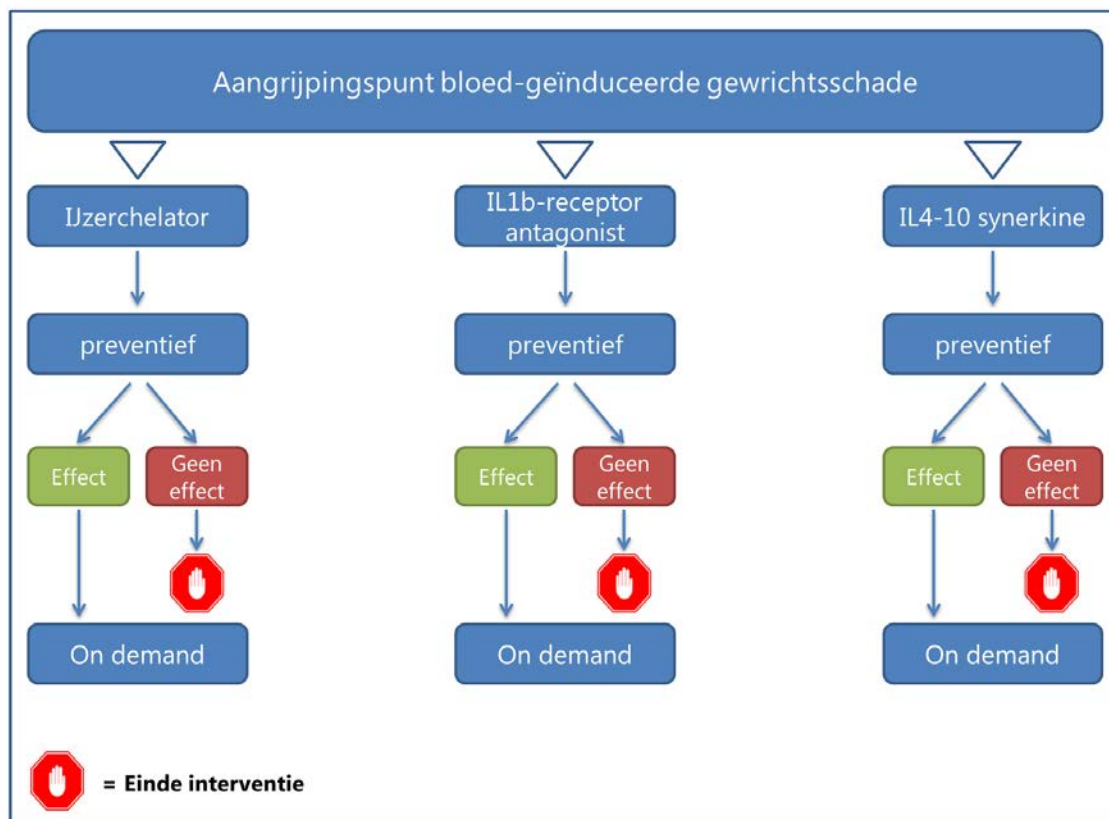


Figuur 2 - Pathogenese van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade en aangrijpingspunten voor potentiële nieuwe therapieën.

1: ijzerchelatie; 2: anti-inflammatoire therapie (IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine); 3: fibrinolyseremmers; 4: neoangiogeneseremmers; 5: kraakbeenregeneratie

Ons onderzoeksproject richt zich op ijzerchelatie en twee vormen van anti-inflammatoire therapie. In figuur 3 is de samenhang van de verschillende onderdelen van het project weergegeven. De experimenten die horen bij interventie A t/m C kunnen onafhankelijk van elkaar worden uitgevoerd. Allereerst wordt gekeken of de interventie effect heeft als het preventief gegeven wordt en daarmee bloedgeïnduceerde schade voorkomt. Bij een positieve bevinding wordt de *on demand* toediening getoetst.

De beperkte beschikbare capaciteit maakt dat we moeten kiezen met welke interventie we beginnen. Als eerste willen we de effecten van ijzerchelatie bestuderen, mede omdat dit middel al klinisch wordt toegepast bij ziektebeelden als hemochromatose en ijzerstapeling door herhaalde bloedtransfusie. Bij succes kan dit de translatie naar de humane kliniek bevorderen. Indien ijzerchelatie niet het gewenste resultaat oplevert, switchen we naar een andere interventie binnen dit project.



Figuur 3 – samenhang projectonderdelen

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Muismodel – Experimenten
2	Muismodel – Fok met ongerief
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Preventie en behandeling van gewrichtsschade na een bloeding
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Gewrichtsschade, gewrichtsbloeding, kraakbeen, synovium, therapie

## 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- 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 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Dit onderzoek richt zich op het ontstaan en behandelen van schade door bloedingen in een gewricht. Gewrichtsbloedingen kunnen ontstaan als gevolg van een ongeluk of operatie, maar kunnen ook optreden door artrose of bloedziekten. Bloed veroorzaakt schade in het gewricht door onder andere het ontstaan van een ontstekingsreactie. Daarnaast speelt ook het vrijkomen van ijzer een rol bij het ontstaan van de schade.</p> <p>Patiënten met bloedingen in de gewrichten hebben vaak al op jonge leeftijd chronische pijn, bewegingsbeperking, invaliditeit en verminderde kwaliteit van leven. Uiteindelijk is vaak een gewrichtsvervangende operatie noodzakelijk. Daarom is een nieuwe behandeling voor schade door bloedingen in het gewricht dan ook zeer wenselijk.</p>
3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	<p>Binnen dit project gaan we met drie verschillende methodes op zoek naar een mogelijke behandeling voor schade door gewrichtsbloedingen. We onderzoeken of deze methoden werken bij muizen met hemofilie A, een erfelijke stoornis in de bloedstolling. Zo willen we bijdragen aan een betere behandeling van schade aan gewrichten als gevolg van bloedingen en het beperken van de gevolgen.</p>
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	<p>In totaal hebben we 470 muizen nodig.</p>
3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	<ul style="list-style-type: none"><li>- Omdat deze muizen hemofilie hebben, is er kans op bloedingen in bijvoorbeeld hun spieren. Vechten is bij deze dieren risicovol, omdat wonden extra kunnen gaan bloeden.</li><li>- De dieren krijgen gewrichtsbloedingen onder verdoving.</li></ul>
3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	<p>Ingeschat ongerief: we schatten het totaal in op matig.</p>
3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	<p>De dieren worden aan het eind van het experiment gedood.</p>

## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

We bestuderen het effect van verschillende behandelingen op het niveau van het gewricht zelf, maar ook in relatie met het hele lichaam. Dat kan alleen in het lichaam. Hemofilie in muizen gedraagt zich als hemofilie in de mens, wat de dieren geschikt maakt voor de experimenten.

### 4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Op basis van specifieke berekeningen zullen we per experiment het exacte aantal berekenen. Daarnaast zullen we tussentijds evalueren of het zinvol is om de experimenten voort te zetten.

### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Er zijn diverse dieren waarin hemofilie spontaan of via genetische modificatie voorkomt. Het voordeel van hemofiliemuizen, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de hond, is dat ze minder de neiging hebben tot spontaan bloeden in weefsels of gewrichten en er dus gericht onderzoek kan worden gedaan. Bovendien is eerder wetenschappelijk onderzoek in deze hemofiliemuizen gedaan, waardoor het vergelijken van resultaten gemakkelijker is. Er is ruime ervaring in onze onderzoeksgroep met dit onderzoeksmodel.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Mannelijke dieren huisvesten we in principe in groepsverband. Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes vanwege de verhoogde bloedingskans alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest.

Bij alle dieren wordt er extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van letsels.

De dieren worden verdoofd voordat we een gewrichtsbloeding bij ze veroorzaken, voordat we bloed afnemen en voordat we het gewricht gaan inspecteren.



[

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



## 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](http://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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef           |
|------------|--------------------------|
| 1          | Muismodel - Experimenten |

*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.

###### Experimentele aanpak

Dit onderzoek kijkt naar verschillende methoden om in te grijpen in het proces van de schade die ontstaat na een gewrichtsbloeding. Tijdens de experimenten wordt gekeken naar het effect van de interventies (ijzerchelator, IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) op bloed-geïnduceerde artropathie. Bij de experimenten wordt de interventie eerst ingezet als preventieve maatregel, om vervolgens bij succes als behandeling (*on demand*) te worden getoetst. Hierbij zal tevens een brede analyse naar de lokale en systemische effecten plaats vinden.

### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameter is histologie post mortem, waarbij de mate van kraakbeenschade en inflammatie van het synovium vastgesteld wordt. Hiervoor worden de gevalideerde Valentino score [23] en Safranin O score [24] gebruikt. De resultaten worden blind beoordeeld door twee onderzoekers. Secundaire uitkomstparameter is macroscopische inspectie, waarbij gekeken wordt naar de mate van zichtbare bloeding en de gewrichtsdiameter. Tevens wordt bloed afgenomen middels een wangpunctie, waarbij verschillende inflammatoire parameters, biomarkers en genotype bepaald worden.

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.

### Behandelingsduur

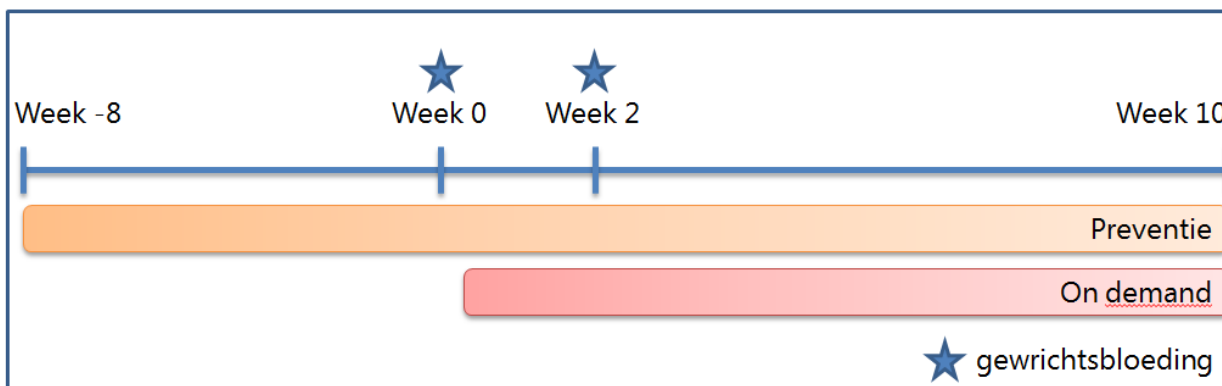
#### *Preventie*

Bij deze experimenten worden de hemofiliemuizen gerandomiseerd tussen de interventie of placebo. De muizen worden behandeld met de interventie tot maximaal 8 weken voor het induceren van de gewrichtsbloeding. In week 0 en week 2 wordt een gewrichtsbloeding geïnduceerd. De behandeling wordt gecontinueerd voor een periode van 10 weken na het induceren van de gewrichtsbloeding. De maximale duur van follow-up in het experiment kan variëren op basis van voortschrijdend inzicht (zowel korter als langer) en wordt specifiek gedefinieerd per experiment.

#### *On demand*

De hemofiliemuizen worden gerandomiseerd tussen de interventie of placebo. Er worden gewrichtsbloedingen geïnduceerd, waarna op een later moment gestart wordt met de interventie. Deze behandeling wordt voor een periode van 10 weken voortgezet. De frequentie van behandeling en maximale duur van follow-up in het experiment kan variëren op basis van voortschrijdend inzicht (zowel korter als langer) en zal per experiment worden gedefinieerd.

Bovenstaande opzet wordt verduidelijkt in figuur 1.



Figuur 1 – Tijdslijn experimenten Preventie en On demand

## Behandeling

De verschillende interventies worden op verschillende wijze toegediend. IL4-10 synerkine en IL1b-receptor antagonist worden intra-articulair gegeven (placebo: intra-articulaire injectie met alleen oplosmiddel). De ijzerchelator wordt opgelost in het drinkwater ('placebo': drinkwater zonder toevoeging).

Hemofilie muizen krijgen, in tegenstelling tot de humane situatie, geen spontane gewrichtsbloedingen. Daarom worden op een gecontroleerde manier gewrichtsbloedingen geïnduceerd naar het muismodel van Hakobyan [8]. De hemofiliemuizen worden verdoofd middels inhalatie anesthesie. Met een 30G naald wordt het kapsel van de rechter knie onder de patella gepuncteerd om een bloeding te induceren. De linker knie wordt niet aangedaan en geldt als een controle. Na twee weken wordt via dezelfde methode een tweede bloeding geïnduceerd. De muizen worden gedood door cervicale dislocatie.

Er is gekozen voor dit muismodel vanwege het relatief beperkte ongerief voor het dier en omdat eerder wetenschappelijk onderzoek gebruik maakte van dit model waardoor resultaten te vergelijken zijn. Bovendien is er ruime ervaring mee opgedaan binnen onze onderzoeksgroep.

---

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

Onze primaire outcome is de Valentino score, een gevalideerde histologische score voor de mate van gewrichtsschade ten gevolge van bloed. Deze score is een categorische score van 0 tot 10. Deze score zal door 2 personen worden uitgevoerd, wat de mogelijkheid geeft tot maximaal 20 categorische variabelen. In overleg met onze biostatisticus ██████████, eveneens verbonden aan het Julius centrum Utrecht, is een algemene vuistregel dat een categorische score van meer dan 5 punten als een continue variabele mag worden beschouwd. Mede op basis van deze vuistregel en onderstaande aannames, die onder andere gebaseerd zijn op onze vorige experimenten met dit model, komen we uit op de volgende algemene sample-size berekening:

Op basis van eerder gedane experimenten is de verwachting dat een minimale effect-size van 0.8 (groot; effect size tussen behandelde poot versus placebo behandelde poot) als klinisch relevant gezien kan worden. Op basis van een alpha van 0.05, een power van 0.8 waarbij 2 onafhankelijke groepen vergeleken worden op 1 primaire outcome, is de verwachting dat groepen van 26 dieren nodig zijn per experiment om een relevant verschil aan te kunnen tonen (berekend met G-power).

**t tests** - Means: Difference between two independent means (two groups)

**Analysis:** A priori: Compute required sample size

<b>Input:</b>	Tail(s)	=	Two
	Effect size d	=	0.8
	$\alpha$ err prob	=	0.05
	Power (1- $\beta$ err prob)	=	0.8
	Allocation ratio N2/N1	=	1
<b>Output:</b>	Noncentrality parameter $\delta$	=	2.8844410
	Critical t	=	2.0085591
	Df	=	50
	Sample size group 1	=	26
	Sample size group 2	=	26
	Total sample size	=	52
	Actual power	=	0.8074866.

Op basis van vorige experimenten verwachten we een uitval van 10% (tot 20%). Daarmee is de verwachting dat we groepen van 30 dieren nodig hebben. Omdat dergelijke groepen te groot zijn om logistiek goed te kunnen hanteren zullen de experimenten gefaseerd worden uitgevoerd. Per stap zal worden bekeken of voortzetting van het experiment zinvol is. Voor de precieze aantallen zal er per experiment een sample size analyse uitgevoerd worden.

## B. De dieren

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

Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J) worden verkregen uit het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Dit zijn genetisch gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie en zijn daarmee een uniek model voor het bestuderen van bloed-geïnduceerde artropathie. De muizen vertonen geen spontane bloedingen, waardoor het model zich leent voor het controleerbaar induceren van gewrichtsbloedingen.

De dieren worden gefokt in het Gemeenschappelijk Dieren Laboratorium (GDL) van de Universiteit Utrecht. Voor de experimenten worden dieren gebruikt tussen de 3 en 4 maanden oud. Zowel mannetjes als vrouwtjes worden ingezet. Per interventie worden er twee type experimenten gedaan (preventief en on demand). Elk type experiment vereist twee groepen: een interventie en placebo groep. De verwachting is dat er per groep 30 dieren nodig zijn. Daarmee komt het verwachte aantal op 360 dieren (3 interventies x 2 type experimenten x 2 groepen per experiment x 30 = 360 dieren). Daarbij komen de vrouwelijke dieren die nodig zijn voor de fok. Per experiment worden 18 fokvrouwtjes gebruikt = 3 interventies x 2 type experimenten x 18 = 108 dieren. De fokmannen kunnen in het experiment worden ingezet. Zie bijlage 2.B.

De motivatie voor de inzet van proefdieren ligt in het feit dat *in vitro* experimenten een beperkte afspiegeling vormen van de *in vivo* situatie bij zo'n complexe pathogenese als bloed-geïnduceerde artropathie. Er zijn geen alternatieven voor handen. Humane studies bij hemofiliepatiënten naar dit onderwerp zijn ethisch en technisch niet haalbaar.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

---

Vervanging: Proeven *in vitro* vormen een beperkte afspiegeling van de omstandigheden *in vivo* bij zo'n complex proces als het ontstaan van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Bovendien willen we het effect van verschillende methodes bestuderen op het niveau van het gewricht zelf, maar ook in relatie met het lichaam als geheel. Er zijn geen alternatieve modellen voor handen (search: Pubmed, Go3R). Hemofilie in hemofilie A muizen gedraagt zich als hemofilie in de mens, waardoor de dieren uitermate geschikt zijn voor de experimenten. Humane studies op dit onderwerp bij hemofiliepatiënten zijn ethisch niet haalbaar.

Vermindering: Hoewel hemofilie in de mens vrijwel alleen bij mannen voorkomt, gebruiken we voor deze experimenten zowel mannetjes als vrouwtjes omdat het genotype dat toelaat. Het gebruik van beide geslachten draagt bij aan het verminderen van het fokoverschot.

Op basis specifieke sample size berekeningen zal per experiment het exacte aantal dieren berekend worden. De verwachting is dat 30 dieren per groep nodig zijn om met voldoende zekerheid een uitspraak te kunnen doen over een specifieke interventie. Daarbij wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door spontane of traumagerelateerde bloedingen ingecalculleerd moet worden. Omdat dergelijke groepen te groot zijn om logistiek goed te kunnen hanteren zullen dergelijke experimenten gefaseerd worden uitgevoerd en per fase bekeken worden of voortzetting van het experiment zinvol is.

*In vitro* experimenten en/of literatuur studie vormen de basis van de doseringen die gebruikt worden in de experimenten, zodat we zo gericht mogelijke dosering kunnen toepassen. Deze voorstudies zorgen er dus voor dat het aantal dieren kan worden verminderd.

Verfijning: Er zijn diverse dieren waarin hemofilie spontaan of via genetische modificatie voorkomt. Zo zijn er hond en muismodellen, die bruikbaar zijn voor preklinische studies *in vivo*. Modellen in ratten, schapen en duiven zijn minder uitgewerkt.

Het voordeel van het muismodel is dat hemofiliemuizen, in tegenstelling tot de hond, minder de neiging hebben tot spontaan bloeden in weefsels of gewrichten. Dit geeft een betere controle over de experimentele condities. Verder is er eerder wetenschappelijk onderzoek in deze hemofiliemuizen gedaan, waardoor het vergelijken van resultaten gemakkelijker is. Daarnaast is er reeds ruime ervaring met dit muismodel in onze onderzoeksgroep opgedaan en is geleerd van eerdere welzijnsevaluaties. Een voorbeeld is dat vrouwtjes maximaal 2 nestjes mogen krijgen, omdat er na meerdere nestjes een grotere kans op overlijden leek te zijn. Sinds het instellen van deze maatregel is er geen oversterfte van de fokvrouwen meer voorgekomen.

---

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.

---

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest. Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressie-gerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest. Bij alle dieren wordt er extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerd trauma.

De dieren worden verdoofd voor het induceren van de gewrichtsbloeding en het inspecteren van het gewricht.

---

## 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.

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest, maar bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressiegerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest.

## G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De dieren worden geanestheseerd voorafgaand aan de handelingen als inspectie van de gewrichtsdiameter, bloedafname en gewrichtspuncties. In eerdere experimenten van onze groep is de mate van ongerief na een gewrichtspunctie zeer gering gebleken, derhalve wordt geen additionele pijnstilling gegeven.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Ten gevolge van het genotype kans op wekedelen bloedingen; agressie- en/of traumagerelateerde bloedingen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.



De oorzaak ligt in het genotype van de muis; de stollingsfactor VIII deficiëntie.

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

Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannelijke dieren vanaf de leeftijd van zes weken alleen gehuisvest. Bij alle dieren wordt extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerde bloedingen.

#### 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.

Humane eindpunten specifiek voor deze studie:

- Ernstige verwondingen / wekedelen bloedingen door agressie of trauma (Hemofiliemuizen bloeden in principe niet spontaan).
- Intra-artculaire ontsteking ten gevolge van lokale behandeling bij interventie arm B en C (kans hier op klein maar mogelijk).

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

Op basis van welzijnsevaluatie 2012 en eerdere ervaringen: 10%.

#### 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.

Ingeschat ongerief gedurende de studie:

- Induceren gewrichtsbloeding x 2: gering
- Bloedafname: gering
- Behandeling middels intra-artculaire toediening: gering (behandeling middels orale toediening: geen ongerief)
- Risico op trauma/agressie gerelateerde verwondingen: gering
- Anesthesie voor de ingrepen: gering

Cumulatief wordt het risico ingeschat op matig.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Histologie postmortem is het primaire eindpunt van deze proef.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef                                |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Fok met ongerief"/> |

*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.

Dit onderzoek kijkt naar verschillende methoden om in te grijpen in het proces van de gewrichtsschade die ontstaat na een bloeding. Tijdens de experimenten wordt gekeken naar het effect van drie interventies (ijzerchelator, IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) op bloed-geïnduceerde artropathie. Om dit onderzoek uit te voeren maken we gebruik van zogenaamde hemofilie A muizen (B6;129S4-F8-tm1Kaz/J). Dit zijn genetische gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno-en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie. De fokpaartjes worden verkregen via het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Deze bijlage omschrijft de opzet voor een fok met ongerief.

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.

Op basis van de sample size berekening zoals beschreven in bijlage I verwachten we 60 muizen per experiment (2 groepen van 30 dieren) nodig te hebben en in totaal zo'n 360 dieren. Om dit benodigde aantal proefdieren te verkrijgen word er een fok met de B6;129S4-F8-tm1Kaz/J muizen opgezet. Er zal worden gestart met 9 fokouders: 3 mannelijke en 6 vrouwelijke proefdieren.

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

Gezien de grootte van de groepen en de beperkte capaciteit zullen de beoogde experimenten gefaseerd uitgevoerd worden, waardoor er per experiment de benodigde nakomelingen gefokt worden. Hierdoor hoeven de muizen niet onnodig lang te zitten. De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd. Dit heeft als voordeel dat er per fase wordt gekeken of het voortzetten van het experiment zinvol is, wat onnodig gebruik van proefdieren kan voorkomen. Voor de uitgebreide statistische strategie verwijzen wij u naar bijlage I paragraaf 2A.

## **B. De dieren**

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

Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J) worden verkregen uit het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Dit zijn genetisch gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie en zijn daarmee een uniek model voor het bestuderen van bloed-geïnduceerde artropathie. Voor onze experimenten hebben we in totaal 360 dieren nodig voor in totaal zes experimenten. We zullen de dieren fokken per experiment en het experiment zelf ook gefaseerd uitvoeren met oog op de logistiek.

Er wordt gestart met 9 fokouders: 3 mannelijke dieren en 6 vrouwelijke proefdieren.

Gegevens muis:

- Geslachtsrijp 5 weken
- Fokrijp 8-10 weken
- Draagtijd 19 (18-21) dagen
- Speenleeftijd 21-28 dagen
- Levensverwachting 1-2 jaar
- Gemiddeld 5 nakomelingen per kruising
- Aantal nestjes per vrouwtje: maximaal 2 (om partus gerelateerde problematiek te voorkomen)

Tijdstip	Vrouwen (N)	Mannen (N)	Totaal (N)	Nakomelingen (N)
Start	6	3	9	
Kruising-1				5 x 6 = 30 (15 vrouw, 15 man)
Na kruising-1	21	18	39	
Kruising-2	(12/21)			5 x 12 = 60 (30 vrouw, 30 man)
Na kruising-2	51	48	99	
Verantwoording gebruik dieren				
• Experiment			60	
• Gebruikt huidige fok			18 (♀)	
• Nodige volgende fok			9	
• Uitval 10%			10	
• Surplus			2	

Bovenstaande tabel is een voorbeeld van hoe we het benodigde aantal dieren voor één experiment fokken. Per experiment zal een nieuwe fokopzet gemaakt worden. Voor één experiment worden 18 vrouwtjes gebruikt, voor dit onderzoeksproject in totaal dus 108 fokvrouwen. De fokmannen kunnen deelnemen aan het experiment.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Proeven *in vitro* vormen een beperkte afspiegeling van de omstandigheden *in vivo* bij zo'n complex proces als het ontstaan van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Bovendien willen we het effect van verschillende methodes bestuderen op het niveau van het gewricht zelf, maar ook in relatie met het lichaam als geheel. Er zijn geen alternatieve modellen voor handen.

Hemofilie in hemofilie A muizen gedraagt zich als hemofilie in de mens, waardoor de dieren uitermate geschikt zijn voor de experimenten. Humane studies op dit onderwerp bij hemofiliepatiënten zijn ethisch niet haalbaar.

Vermindering: Hoewel hemofilie in de mens vrijwel alleen bij mannen voorkomt, gebruiken we voor deze experimenten zowel mannetjes als vrouwtjes omdat het genotype dat toelaat. Daarnaast kunnen de fokmannetjes ook ingezet worden in het experiment zelf. Het gebruik van beide geslachten en de fokmannetjes in het experiment zelf dragen bij aan het verminderen van het fokoverschot en de hoeveelheid dieren.

We berekenen op basis van specifieke sample size berekeningen per experiment het exacte aantal dieren. Bij de berekening wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door spontane of traumagerelateerde bloedingen ingecalculeerd moet worden. De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd. Dit heeft als voordeel dat er per fase wordt gekeken of het voortzetten van het experiment zinvol is, wat onnodig gebruik van proefdieren kan voorkomen. Daarnaast worden de dieren ook per experiment gefokt, zodat de muizen niet onnodig lang zitten.

Verfijning: Er zijn diverse dieren waarin hemofilie spontaan of via genetische modificatie voorkomt. Zo zijn er hond en muismodellen, die bruikbaar zijn voor preklinische studies *in vivo*. Modellen in ratten, schapen en duiven zijn minder uitgewerkt.

Het voordeel van het muismodel is dat hemofiliemuizen, in tegenstelling tot de hond, minder de neiging hebben tot spontaan bloeden in weefsels of gewrichten. Dit geeft een betere controle over de experimentele condities en de fok. Daarnaast is er reeds ruime ervaring met het fokken van deze muizen in onze onderzoeksgroep opgedaan en is geleerd van eerdere welzijnsevaluaties. Een voorbeeld is dat vrouwtjes maximaal 2 nestjes mogen krijgen, omdat er na meerdere nestjes een grotere kans op overlijden leek te zijn. Sinds het instellen van deze maatregel is er geen oversterfte van de fokvrouwen meer voorgekomen.

---

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.

---

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest. Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressie-gerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest. Bij alle dieren wordt er extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerd trauma.

Uit onze ervaring met het fokken van hemofiliemuizen blijkt dat er geen partusgerelateerde uitval ontstaat als vrouwtjes maximaal twee nestjes krijgen. Dit hebben we dan ook opgenomen in ons fokprotocol.

---

## 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.

Fokmannen worden solitair gehuisvest. De overige mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest, maar bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressiegerelateerd trauma worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest.

#### **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?

Er is een hoger risico op wekedelen bloedingen en agressie- en/of trauma gerelateerde bloedingen. Uit onze ervaring blijkt dat er geen partusgerelateerde uitval gezien wordt als vrouwtjes maximaal twee nestjes krijgen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak voor de verhoogde kans op wekedelen bloedingen bij agressie of trauma is de stollingsfactor VIII deficiëntie, ook bij de homozygote vrouwtjes.

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

Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannelijke dieren vanaf de leeftijd van zes weken alleen gehuisvest. Bij alle dieren wordt extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerde bloedingen. Vrouwtjes krijgen maximaal twee nestjes.



#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

#### K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief wordt ingeschat als licht.

### 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.

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.550.041
2. Titel van het project : Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade
3. Titel van de NTS : Preventie en behandeling van gewrichtsschade na een bloeding

## 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: 05-11-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 18-11-2015 en 16-12-2015  
 anderszins behandeld: per mail: 05-01-2016  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 20-11-2015 tot 30-11-2015  
18-12-2015 tot 04-01-2016  
13-01-2016 tot 15-01-2016  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 24-02-2016

## 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: 20-11-2015
- Strekking van de vragen:

Projectvoorstel

- Het gebruik van ijzerchelatoren: Zou u in uw aanvraag een betere en meer inhoudelijke toelichting kunnen geven op de werking van ijzerchelatoren in uw model? Welke bijwerkingen verwacht u? Zijn er klinische aanwijzingen dat het gebruik van ijzerchelatoren bij patiënten met hemofilie helpt of het gewrichtsschadeproces op zijn minst vertraagt? In dit kader vraagt de DEC zich af of dit onderdeel van de studie niet direct in patiënten kan plaatsvinden in plaats van in proefdieren.
- 3.1 Achtergrond: U vermeldt hier alleen de kosten van de bloedstollingsproducten als probleem en niet het feit dat orthopedisch ingrijpen ook geregeld moet worden toegepast. Dit in tegenstelling tot wat u schrijft onder 3.3. Graag aanpassen.
- 3.4.1. De DEC mist de motivatie voor de inductie van een tweede bloeding.
- 3.4.2 Graag de fok hier opnemen als onderdeel D, aangezien de fok een onderdeel is van het project.
- 3.4.3 In figuur 3 staat de term 'on demand' genoemd. Zou het niet beter zijn deze term te vervangen door 'therapeutisch'? Deze suggestie geldt ook voor de rest van de aanvraag.

#### Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters
- Pagina 3. Graag de naam van de biostatisticus verwijderen voordat het naar de CCD gaat. Dit in verband met een mogelijk WOB-verzoek.
- Zijn de concentraties van de toe te dienen stoffen al bekend of moet dit nog uitgezocht worden? Zo ja, heeft dit dan geen consequenties voor de aantallen te gebruiken dieren?
- Op bladzijde 4 van 8 bovenaan staat een uitvalspercentage (tot 20%) genoemd. Op pagina 7 van 8 noemt u een percentage van 10 %. Kunt u deze inconsequentie vermijden?
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: U schrijft: 'Sinds het instellen van deze maatregel is er partusgerelateerde problematiek van fokvoruwen meer voorgekomen.' Ontbreekt hier niet het woord 'geen'?
- K. Classificatie van ongerief: De ongeriefsinschatting 'gering' wordt niet meer gebruikt, dit moet 'licht' zijn, graag wijzigen. Behandeling middels orale toediening moet ingeschaald worden als licht ongerief. Graag aanpassen in de aanvraag.

#### Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen, 2e zin: Achter bloedziekte graag de term hemofilie toevoegen.
- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: De term 'gering' graag vervangen door 'licht'.
- Datum antwoord: 30-11-2015
- Strekking van de antwoorden:

#### Projectvoorstel

- De pathogenese van bloed-geïnduceerde kraakbeen schade is multifactorieel. Door herhaaldelijke bloedingen in het gewricht ontstaat er chronische inflammatie van het synovium en kraakbeenschade. In beide processen speelt ijzer een belangrijke rol. Ijzer heeft een proliferatief effect op het synovium [8] en ijzerrijk synoviaal weefsel produceert meer pro-inflammatoire cytokines (zoals IL-1 $\beta$ , IL-6 en TNF- $\alpha$ ) in vergelijking met normaal synoviaal weefsel [9]. Ijzer uit de erythrocyten kan via de Fenton-reactie zorgen voor de productie van toxische hydroxyl radicalen met apoptose van chondrocyten als gevolg [10]. Het menselijk lichaam is niet in staat zelfstandig ijzer uit te scheiden. Deferasirox is een orale ijzerchelator, die wordt gebruikt bij patiënten met ijzerstapelingsziekten, zoals hemochromatose en transfusie geïnduceerde ijzeroverload. Twee moleculen deferasirox zijn nodig om één ijzermolecuul te binden. Dit complex wordt vervolgens via de feces uitgescheiden [20]. Op deze manier is deferasirox in staat om ijzer aan lichaamsvloeistoffen en weefsels te onttrekken. In eerder dierexperimenteel onderzoek lijkt profylactisch gegeven deferasirox het kraakbeen te beschermen bij hemartrose geïnduceerd in hemofilie muizen [21]. De hypothese is dat schade aan het gewricht vermindert door het onttrekken van ijzer in het geval van een gewrichtsbloeding. Bijwerkingen ijzerchelator: deferasirox wordt systemisch toegepast in de mens. De meest voorkomende bijwerkingen bij de mens zijn stijging van de plasma creatinine en gastro-intestinale klachten. In de eerdere muisstudie met deferasirox werden geen opvallende bijwerkingen zien. Bijwerkingen IL1 $\beta$  en IL4-10 synerkinen: deze middelen zullen lokaal worden toegepast (intra-articulair). Hierbij verwachten we geen systemische bijwerkingen. Lokaal kan er een lichte reactie op de intra-articulaire injectie ontstaan.

Er zijn geen klinische studies over het effect van ijzerchelatoren bij hemofiliepatiënten. Het uitvoeren van deze studie in hemofiliepatiënten is niet haalbaar. Allereerst hebben de patiënten stollingsfactoren tot hun beschikking, wat zou interfereren met de studieopzet om het potentiële effect van de ijzerchelator te onderzoeken. Het is niet ethisch om patiënten deze stollingsfactoren te onthouden. Daarnaast is een gewrichtsbloeding in hemofiliepatiënten niet te voorspellen, laat staan in welk gewricht. Daarmee vervalt de optie dat de patiënt zelf zijn eigen controle kan zijn (bijvoorbeeld: aangedane knie vs controle knie). Bovendien is het voor hemofiliepatiënten lastig een gewrichtsbloeding te onderscheiden van een flare-up van hun hemofilie artropathie, wat de afweging om te starten met een ijzerchelator bemoeilijkt. De schade aan het gewricht ontstaat direct bij de eerste bloeding. Niet altijd zijn deze eerste effecten te zien op beeldvorming, al is een MRI wel gevoelig. Histologisch onderzoek is daarom een logische primaire uitkomstmaat. Het is niet ethisch om bij levende patiënten materiaal voor histologisch onderzoek te verkrijgen. Een kraakbeen biopt zou het toch al aangedane gewricht verder verslechteren. Hemofiliemuizen zijn factor VIII deficiënt, maar bloeden niet spontaan (en hebben dus nog geen gewrichtsschade opgelopen). De gewrichtsbloedingen kunnen volgens een vast protocol geïnduceerd worden. Daarnaast krijgen de hemofiliemuizen geen factorconcentraat. Tenslotte is het mogelijk om via histologie postmortem het effect van deferasirox op

weefselniveau in detail te bestuderen, waarbij we gebruik maken van reeds bestaande gevalideerde scores.

- 3.1 Achtergrond: We hebben dit aangepast in 3.1 en 3.3 van het projectvoorstel.
- 3.4.1 Eerdere dierproeven (DEC 2013.II.04.046) door ons uitgevoerd hebben laten zien dat met de dubbele inductie voldoende schade ontstaat om een uitspraak te kunnen doen over het effect van de interventies. Bovendien weerspiegelt dit de humane situatie, waarbij repeterende bloedingen nodig zijn voor de ontwikkeling van hemofilie artropathie.
- 3.4.2 De fok is opgenomen als onderdeel D van het overzicht op hoofdlijnen in 3.4.2 van het projectvoorstel.
- 3.4.3 We hebben de term 'on demand' vervangen door 'therapeutisch' in alle documenten.

#### Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De naam is verwijderd uit bijlage I -A3.
- De concentraties van de stoffen zijn bepaald op basis van in vitro werk of eerder dierexperimenteel werk: deferasirox 30 mg/kg en IL4-10 synerkine 7pmol/3µl i.a.. Mocht er sprake zijn van voortschrijdend inzicht, wordt dit aangepast. De dosering van IL-1B wordt nader bepaald. Het exact te gebruiken aantal dieren zal per experiment worden berekend.
- Deze inconsequentie is aangepast in de aanvraag.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Dat klopt
- K. Classificatie van ongerief: Dat is aangepast

#### Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: Aangepast
- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: Aangepast
  
- Datum: 18-12-2015
- Strekking van de vragen:
  - De DEC dankt u voor uw uitgebreide antwoord. De DEC heeft uit uw antwoord nog niet geheel begrepen of chelatie van ijzer het ontstaan van een anemie bevordert en of controle daarop is meegenomen in de aanvraag. Graag toelichten.
- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.1: Het wordt uit de tekst nog niet duidelijk of er na één inductie onvoldoende schade is, graag duidelijker opschrijven.
  
- Datum antwoord: 04-01-2016
- Strekking van de antwoorden:
  - In de literatuur wordt beschreven dat de ijzerchelator deferasirox een anemie kan verergeren bij reeds bestaande hematologische aandoeningen waarbij het beenmerg is aangedaan. De hemofiliemuizen hebben géén onderliggende hematologische aandoening van dien aard of reeds bestaande anemie, dus lopen hier minder kans op. In een eerdere proof-of-concept studie (DEC 2009.III.08.067) waarbij deferasirox twee maanden aan hemofiliemuizen is

gegeven, zijn plasma ferritine levels bepaald (afgeleide van ijzeropslag in het lichaam). Hierbij is een gemiddeld level van 823 ng/ml  $\pm$ 56 gemeten in de hemofiliegroep (controlegroep 1220 ng/ml  $\pm$ 114). Er zijn geen referentiewaarden bij muizen bekend. Daarom meten we in de komende studies op de momenten dat bloed wordt afgenomen de ijzerparameters en Hb-waarden in het bloed.

- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.1: Eerdere proeven in hemofiliemuizen door onze onderzoeksgroep uitgevoerd, hebben laten zien dat één gewrichtsbloeding zeer geringe gewrichtsschade geeft. Met dubbele inductie wordt er voldoende schade gecreëerd om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over het effect van de interventies (zie ook DEC 2013.II.04.046). Bovendien weerspiegelt dit meer de humane situatie, waarbij repeterende bloedingen nodig zijn voor de ontwikkeling van hemofilie artropathie.
  
- Datum: 13-01-2016
- Strekking van de vraag:
- De DEC is nog niet helemaal tevreden met het antwoord op de vraag of chelatie van ijzer bij muizen met hemophilie kan leiden tot een anaemie en of u daarop controleert. U geeft aan dat u naast het hemoglobinegehalte ook ijzer parameters (welke?) vervolgt, waaronder ferritine. Echter, ferritine is een acuut fase eiwit en het is daarom de vraag of deze wel een goede uitleesparameter is voor het mogelijk ontstaan van anaemie. De DEC adviseert daarom het volume van de erythrocyten en zo mogelijk ook MCH en MCHC als uitleesparameters mee te nemen in uw onderzoek.
  
- Datum antwoord: 15-01-2016
- Strekking van het antwoord:
- Om een eventuele anemie ten gevolge van de ijzerchelatie goed in beeld te brengen, zullen we bij de geplande bloedafnames ook het hemoglobine, MCV en ferritine bepalen. Tevens wordt post-mortem histologisch onderzoek gedaan naar het ijzergehalte in de weefsels (onder andere hart, lever, milt). De literatuur geeft aan dat van alle ijzerparameters ferritine, de afgeleide van ijzeropslag in het lichaam, veruit het meest waardevol voor de diagnostiek is [Guyatt 1992]. Ferritine is inderdaad een acuut-fase eiwit. De bloedafnames zullen echter plaats vinden aan het einde van de studie en op dat moment zijn meerdere weken verstreken sinds het acute moment (de twee gewrichtsbloedingen). Daarom verwachten we geen verstoring van deze bepaling. In een eerdere proof-of-concept studie (DEC 2009.III.08.067) waarbij deferasirox twee maanden aan hemofiliemuizen is gegeven, zijn plasma ferritine levels bepaald. Hierbij is een gemiddeld level van 823 ng/ml  $\pm$ 56 gemeten in de deferasiroxgroep (controlegroep 1220 ng/ml  $\pm$ 114). In beide groepen zijn geen opvallende bijwerkingen gezien. Bovengenoemde labbepalingen zijn overigens niet gestandaardiseerd voor (hemofilie)muizen, dus de vergelijking zal vooral tussen groepen in de studie zinvol zijn. Het observeren van de proefdieren gedurende de proef om op tijd eventueel ongerief te detecteren is het belangrijkste.

- Datum: 11-02-2016
- Strekking van de vragen:
- De DEC stuit bij het afronden van het advies voor de CCD en het opnieuw in detail bestuderen van uw projectaanvraag op enkele punten die nog om verduidelijking vragen. Bijlage 1, punt A, pagina 4: In uw berekening van het benodigde aantal dieren houdt u rekening met 10% uitval. Aangezien uw powerberekening een groeps grootte van 26 dieren oplevert heeft u strikt genomen (26+3=) 29 dieren per groep nodig. U vraagt echter 30 dieren per groep aan. De DEC adviseert u dit aantal aan te passen of nader toe te lichten.
- Bijlage 1, punt D, pagina 5: Hier schrijft u 'Na elke fase wordt aan de hand van de behaalde resultaten beoordeeld of voortzetting van het experiment zinvol is, wat onnodig proefdiergebruik kan voorkomen.' Ook op andere plaatsen in de projectaanvraag komt deze zin terug. De DEC adviseert u helder uiteen te zetten op basis van welke criteria wordt besloten of u wel of niet doorgaat met een experiment.
- Bijlage 2, punt I: Hier schrijft u 'Er is een hoger risico op wekedelen bloedingen en agressie- en/of trauma gerelateerde bloedingen.' Maar bij punt J staat aangegeven dat u niet verwacht dat dieren het humane eindpunt zullen bereiken. De DEC vermoedt dat dit een vergissing is, aangezien mannelijke nakomelingen bij tekenen van onderliggen agressie vanaf een leeftijd van 6 weken solitair gehuisvest worden, maar op dat moment al bloedingen t.g.v. vechten opgelopen kunnen hebben. In bijlage 1 geeft u onder punt J namelijk ook aan dat uitval t.g.v. bloedingen na vechten (en ontstekingen na intra- articulaire injecties) te verwachten is. De DEC adviseert u punt J in bijlage 2 aan te passen, of nader toe te lichten waarom u geen uitval verwacht.
- Bijlage 2, pagina 3: Hier schrijft u 'Bij de berekening wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door spontane of traumagerelateerde bloedingen ingecalculeerd moet worden.' Bijlage 2, pagina 5: Ook hier schrijft u: 'Daarbij wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door spontane of traumagerelateerde bloedingen ingecalculeerd moet worden.' De DEC vraagt zich af of het wel juist is om rekening te houden met spontane bloedingen, aangezien het (vaak genoemde) voordeel van dit model juist is dat muizen geen spontane bloedingen vertonen. De DEC adviseert u deze zinnen aan te passen, of nader toe te lichten wat u bedoelt met de spontane bloedingen.
  
- Datum antwoord: 22-02-2016
- Strekking van de antwoorden:
- Bijlage 1, punt A, pagina 4: Dit is aangepast.
- Bijlage 1, punt D, pagina 5: Hiervoor verwijzen we naar het Projectvoorstel, figuur 3 in paragraaf 3.4.3 waarin de samenhang tussen de verschillende projectonderdelen wordt beschreven. Elke interventie kent een preventieve en therapeutische toepassing. Indien op basis van onze primaire uitkomstparameters (de gevalideerde Valentino en Safranin O score) blijkt dat een interventie preventief onvoldoende effect heeft, wordt die tak gestopt en wordt de interventie niet in therapeutische opzet getoetst. De gedachte daarachter is dat als



langere blootstelling aan de interventie (dus nog voor de inductie van gewrichtsschade) geen effect heeft, kortere blootstelling ook niet zinvol is.

- Bijlage 2, punt I: In bijlage 2 is nu beschreven dat ernstige verwondingen / wekedelen bloedingen door agressie of trauma als humaan eindpunt geldt voor de fok.
- Bijlage 2, pagina 3: Deze zinnen zijn 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 hoofddoelstellingen.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het onderzoek in de voorliggende projectaanvraag is gericht op nieuwe vormen van behandeling en preventie van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade. Gewrichtsbloedingen kunnen verschillende oorzaken hebben en optreden ten gevolge van bijvoorbeeld trauma, artrose of bloedziekten zoals hemofilie. Herhaaldelijke spontane gewrichtsbloedingen leiden bij hemofiliepatiënten vaak al op jonge leeftijd tot chronische pijn, bewegingsbeperkingen, invaliditeit en verminderde kwaliteit van leven. Een therapie met stollingsfactoren kan het optreden van gewrichtsbloedingen bij deze patiënten niet voorkomen, en een effectieve behandeling van eenmaal ontstane gewrichtsschade is tot op heden niet mogelijk. Uiteindelijk is vaak een gewrichtsvervangende

operatie noodzakelijk. Daarom is er grote behoefte aan nieuwe vormen van preventie en behandeling van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade bij hemofiliepatiënten. De pathogenese van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade is nog niet tot in detail opgehelderd. Wel is bekend dat ijzer en pro-inflammatoire cytokinen daarin een belangrijke rol spelen (zie figuur 2 in de projectaanvraag). Dit wordt bevestigd door recente *in vitro* en *in vivo* experimenten die hebben laten zien dat ijzer en pro-inflammatoire cytokinen veelbelovende aangrijpingspunten vormen voor preventief en therapeutisch ingrijpen. De aanvrager wil met dit project voor een drietal stoffen (een ijzerchelator, een IL1b-receptorantagonist en een IL4-10 synerkine) nader onderzoeken of deze bloedgeïnduceerde gewrichtsschade kunnen voorkomen en/of reduceren. De resultaten van dit project kunnen bijdragen aan verbeterde preventie en behandeling van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade bij hemofiliepatiënten, meer inzicht geven in de pathogenese, en mogelijk nieuwe aangrijpingspunten voor interventies identificeren. De DEC schat het belang in als substantieel.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het project bestaat uit twee logisch met elkaar samenhangende onderdelen. Eerst worden muizen gefokt die een stollingsfactor VIII-deficiëntie hebben (bijlage 2). Deze muizen zijn een erkend geno- en fenotypisch model voor humane hemofilie. Vervolgens worden de muizen gebruikt om de effecten van preventieve en therapeutische interventies op bloedgeïnduceerde gewrichtsschade te onderzoeken (bijlage 2). Doordat de muizen geen spontane gewrichtsbloedingen vertonen – in tegenstelling tot andere dieren die als model voor humane hemofilie in dierexperimenteel onderzoek ingezet worden – kan bij de dieren op gecontroleerde wijze in één knie een bloeding geïnduceerd worden, terwijl de andere knie kan fungeren als controle. Eerst zal worden onderzocht of een preventief toegediende stof bloedgeïnduceerde gewrichtsschade kan voorkomen. Alleen wanneer een interventie in de preventieve setting werkzaam is gebleken zal worden onderzocht of dezelfde stof ook in staat is om na therapeutische toediening reeds ontstane bloedgeïnduceerde gewrichtsschade te reduceren. 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 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)

In verband met verhoogde kans op bloedingen ten gevolge van vechten worden de mannelijke fokdieren uit bijlage 2 solitair gehuisvest. De andere mannelijke dieren uit de bijlagen 1 en 2 worden in principe in groepsverband gehouden, maar bij tekenen van onderlinge agressie ook solitair gehuisvest (vanaf een leeftijd van zes weken).

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor alle dieren in bijlage 2 wordt ingeschat als licht, omdat alle dieren hemofilie hebben en daardoor een verhoogde kans hebben op bloedingen ten gevolge van vechten of ander trauma. Voor de dieren in bijlage 1 wordt het ongerief ten gevolge van hemofilie en experimentele handelingen (zoals het induceren van gewrichtsbloedingen, intra-articulaire injecties, bloedafnamen, en herhaaldelijk bijkomen uit anesthesie) ingeschat als matig. Men houdt er rekening mee dat maximaal 10% van de dieren in bijlage 1 het humane eindpunt bereikt ten gevolge van bloedingen na vechten of door een ontsteking na een intra-articulaire injectie. In bijlage 2 houdt men rekening met een uitval van maximaal 10% ten gevolge van bloedingen na vechten.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De interacties tussen bloed, kraakbeencellen, synovium en immuuncellen die leiden tot bloedgeïnduceerde gewrichtsschade zijn dusdanig complex, dat deze niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden. *In vitro* experimenten zullen wel uitgevoerd worden wanneer de toe te dienen dosering van een stof nog nader bepaald moet worden. In verband met de opzet van het onderzoek (inductie van gewrichtsbloedingen) en de aard van de benodigde gegevens (onder andere histologisch onderzoek van gewrichtskraakbeen) is het niet mogelijk om het onderzoek in gezonde proefpersonen uit te voeren. In de projectaanvraag en de correspondentie met de DEC is door de aanvrager helder uiteengezet waarom het ook niet mogelijk is om het onderzoek in humane hemofiliepatiënten uit te voeren.
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 eerder uitgevoerde experimenten met het beschreven model zullen powerberekeningen worden uitgevoerd, zodat het optimale aantal dieren per groep vooraf bepaald kan worden. Daarbij zal rekening gehouden worden met de maximale te verwachten uitval ten gevolge van bloedingen na vechten. Naar verwachting zal een groepsgrootte van 29 dieren noodzakelijk zijn om betrouwbare uitspraken te kunnen doen over de effecten van de interventies. Omdat het logistiek niet mogelijk is om de experimenten met 292 dieren per interventie- en placebogroep in één keer uit te voeren zullen de experimenten gefaseerd plaatsvinden. Na elke fase wordt aan de hand van de behaalde resultaten beoordeeld of voortzetting van het experiment zinvol is, waardoor onnodig proefdiergebruik voorkomen kan worden. Voor de experimenten van bijlage 1 zullen zowel de mannelijke als de vrouwelijke nakomelingen uit bijlage 2 ingezet worden. Door de fokmannen uit bijlage 2 ook in te zetten

voor de experimenten uit bijlage 1 wordt het aantal benodigde proefdieren verder teruggebracht.

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 muizen die in het voorliggende project ingezet worden hebben een stollingsfactor VIII-deficiëntie, met als gevolg een verhoogde kans op bloedingen ten gevolge van trauma. Dit muismodel is een erkend en veelgebruikt model voor humane hemofilie. Het voordeel van muizen ten opzichte van andere dieren die als modeldier voor humane hemofilie ingezet worden is dat ze geen spontane gewrichtsbloedingen vertonen. Daardoor kan de bloeding en daaropvolgende gewrichtsschade op een gecontroleerde manier geïnduceerd worden, en kan de knie waarbij geen bloeding veroorzaakt wordt fungeren als controle. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met dit diertype. Zo weet men bijvoorbeeld dat twee achtereenvolgende inducties van een bloeding in het kniegewricht noodzakelijk zijn om een gewrichtsbloeding te bewerkstelligen die voldoende gewrichtsschade tot gevolg heeft en de situatie in de mens zo goed mogelijk benadert. Ook hebben welzijnsevaluaties van eerdere experimenten uitgewezen dat vrouwtjes met hemofilie na het krijgen van twee nesten een aanzienlijk grotere kans hebben om het humane eindpunt te bereiken. Door de vrouwelijke muizen niet vaker dan twee keer in te zetten voor de fok kan de eerder waargenomen partusgerelateerde problematiek in het voorliggende project voorkomen worden. Om ongerief ten gevolge van bloedingen na trauma/vechten zoveel mogelijk te voorkomen wordt extra bedding verstrekt. Op verzoek van de DEC gaat de onderzoeksgroep zowel tijdens het experiment als post mortem bepalen of de toediening van de ijzerchelator niet toch tegen de verwachtingen in een anemie induceert (voor details verwijst de DEC graag naar de correspondentie onder A8). De dieren uit bijlage 2 zullen per gepland experiment van bijlage 1 gefokt worden, zodat de muizen niet onnodig lang in voorraad moeten zitten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

#### **D. Ethische afweging**

Op grond van de onder C genoemde overwegingen is de DEC van mening dat het belang van de doelstelling – het onderzoeken van de preventieve en therapeutische effecten van verschillende interventies op het ontstaan van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade – substantieel is. Het projectvoorstel is vanuit wetenschappelijk oogpunt verantwoord. Translatie van onderzoeksresultaten naar de mens wordt mogelijk geacht, omdat men gebruik maakt van een erkend model voor humane hemofilie en bloedgeïnduceerde gewrichtsschade. De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat het diertype en de verschillende experimenten noodzakelijk zijn voor het bereiken van de doelstelling. De DEC is ervan overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven, onder andere omdat de onderzoeksgroep

veel ervaring heeft met het model, de experimenten gefaseerd worden uitgevoerd, en de interventies pas in een therapeutische setting worden onderzocht wanneer hun werkzaamheid in een preventieve setting is aangetoond. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van het voorliggende onderzoek opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren zullen ondervinden, en dat het gebruik van de dieren voor dit project 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

### **Dierexperimentencommissie Utrecht**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC 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  
AVD115002016451

**Bijlagen**

2

Datum 26 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016451. 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](http://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: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30244197  
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]



**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 april 2016  
Geplande einddatum: 1 april 2021  
Titel project: Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade  
Titel niet-technische samenvatting: Preventie en behandeling van gewrichtsschade na een bloeding  
Naam DEC: DEC Utrecht  
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: 23 februari 2016

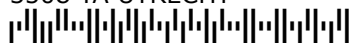


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 80011

3508 TA 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  
AVD115002016451

**Bijlagen**

2

Datum 26 februari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 26 februari 2016

Vervaldatum: 27 maart 2016

Factuurnummer: 16700451

Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002016451	€ 741,00

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

**Van:** [redacted]  
**Verzonden:** woensdag 23 maart 2016 14:53  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [redacted]  
**Onderwerp:** RE: aanvraag AVD115002016451  
**Categorieën:** Dossier: [redacted]

Geachte mevrouw [redacted]

Na overleg met de onderzoeker blijkt dat er vanuit de IvD een verouderde versie naar u is verzonden. Hiervoor excuses. Een recente versie is via de beveiligde verbinding naar u verzonden.

Hopelijk kan de beoordeling van deze projectaanvraag snel doorgang vinden.

Met vriendelijke groet,

[redacted] • *Secretaresse* • [redacted] • [redacted] • kamer [redacted]  
 • [redacted]  
 [redacted] • [redacted] • aanwezig ma, di, wo, vr

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** woensdag 23 maart 2016 13:50  
**To:** [redacted]  
**Cc:** [redacted]  
**Subject:** aanvraag AVD115002016451

Geachte [redacted]

U heeft een aanvraag voor projectvergunning gedaan bij de CCD. het betreft uw project 'Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade' met aanvraagnummer AVD115002016451. Wanneer wij de ingediende aanvraag naast het DEC advies leggen, wordt duidelijk dat niet alle door de DEC voorgestelde veranderingen zijn doorgevoerd. Onder anderen is de term "on demand" niet vervangen voor therapeutisch in de documenten, ook staat in bijlage 3.4.4.1 de naam van de biostatisticus nog genoemd. Wij willen u vragen te controleren of de juiste versie van de formulieren bij de aanvraag is gevoegd,

Wanneer wij de juiste versie van de formulieren die zijn aangepast na correspondentie met de DEC hebben ontvangen nemen wij uw aanvraag verder in behandeling,

Met vriendelijke groet, [redacted]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

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





## 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](http://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.

Gewrichtsbloedingen kunnen ontstaan als gevolg van trauma [1] of operatie [2], maar worden ook gezien in het kader van artrose [3], pigmented villonodular synovitis [4] of ziekten met een verhoogde bloedingsneiging zoals hemofilie [5]. Ongeacht de oorzaak, veroorzaakt recidiverende hemartrose kraakbeenschade en chronische inflammatie van het synovium en resulteert uiteindelijk in bloed-geïnduceerde artropathie [6]. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat onder andere ijzer, dat bij een bloeding intra-articulair vrijkomt uit erythrocyten, daarbij een cruciale rol speelt [7]. IJzer heeft een proliferatief effect op het synovium [8] en ijzerrijk synoviaal weefsel produceert meer pro-inflammatoire cytokines (zoals IL-1 $\beta$ , IL-6 en TNF- $\alpha$ ) in vergelijking met normaal synoviaal weefsel [9]. IJzer uit de erythrocyten kan via de Fenton-reactie zorgen voor de productie van toxische hydroxyl radicalen met apoptose van chondrocyten als gevolg [10].

Hemofilie wordt beschouwd als de prototypische ziekte die model staat voor de pathobiologie van bloed-geïnduceerde artropathie [11]. Hemofilie is een erfelijke X-linked recessieve stollingsfactordeficiëntie van factor VIII (Hemofilie A) en IX (Hemofilie B) [12]. Patiënten met ernstige hemofilie (FVIII/IX < 1%) krijgen frequent spontane gewrichtsbloedingen, waarbij de knieën, ellebogen en enkels het vaakst zijn aangedaan [13]. Patiënten ervaren chronische pijn, bewegingsbeperkingen, invaliditeit en een verminderde kwaliteit van leven, vaak al op een zeer jonge leeftijd (minder dan 30 jaar) [14]. Uiteindelijk is vaak orthopedisch ingrijpen noodzakelijk [15,16]. Chirurgische procedures worden echter bemoeilijkt door de verminderde hemostase en zijn bovendien erg kostbaar.

Met stollingsfactorconcentraat kan het aantal gewrichtsbloedingen bij hemofiliepatiënten worden gereduceerd, maar niet geheel voorkomen worden [17]. Daarnaast is stollingsfactor-concentraat slechts in een beperkt aantal landen beschikbaar vanwege de hoge kosten. Wereldwijd heeft de meerderheid van de hemofiliepatiënten geen toegang tot deze behandeling. Verder ontwikkelt 1/3 van de hemofiliepatiënten antistoffen tegen het stollingsfactorconcentraat (remmers) [18]. Voor deze patiëntengroep is geactiveerd prothrombine complex concentraat of recombinant factor VIIa beschikbaar, maar deze behandeling is duur en minder effectief waardoor er evengoed herhaaldelijke gewrichtsbloedingen kunnen ontstaan [19]. Daarom zijn nieuwe vormen van therapie voor bloed-geïnduceerde gewrichtsschade noodzakelijk.

De afgelopen jaren is door onze groep kennis vergaard over de pathogenese van gewrichtsbloedingen en zijn de eerste stappen naar mogelijke nieuwe behandelingen bestudeerd. Een aantal voorbeelden hier van zijn:

- A) Deferasirox is een orale ijzerchelator, die wordt gebruikt bij patiënten met ijzerstapelingsziekten. Het menselijk lichaam is niet in staat zelfstandig ijzer uit te scheiden. Twee moleculen deferasirox zijn nodig om één ijzermolecuul te binden. Dit complex wordt vervolgens via de feces uitgescheiden [20]. Op deze manier is deferasirox in staat om ijzer aan lichaamsvloeistoffen en weefsels te onttrekken. In eerder dierexperimenteel onderzoek lijkt profylactisch gegeven deferasirox het kraakbeen te beschermen bij hemartrose geïnduceerd in hemofilie muizen [21]. De hypothese is dat schade aan het gewricht vermindert door het onttrekken van ijzer in het geval van een gewrichtsbloeding.
- B) Van interleukine-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) is aangetoond dat het een cruciale factor is in de ontwikkeling van bloed-geïnduceerde kraakbeenschade *in vitro*. Het

- blokken van deze pro-inflammatoire cytokine met een monoklonaal antilichaam beschermt het kraakbeen tegen schadelijke effecten bij blootstelling aan bloed [22]. Het remmen van de productie van IL1b zou dus ook *in vivo* een behandelingsoptie kunnen zijn.
- C) Het IL4-10 synerkine is een fusie-eiwit bestaande uit IL-4 en IL-10. Van IL-4 en IL-10 is bekend dat ze de productie van pro-inflammatoire cytokines die vrijkomen bij een gewrichtsbloeding, zoals IL-1 $\beta$ , IL-6 en TNF- $\alpha$ , remmen [23]. Een combinatie van IL-4 en IL-10 *in vitro* voorkomt gewrichtsschade na een geïnduceerde bloeding [24] en zou daarmee ook *in vivo* een behandelingsmodaliteit kunnen zijn.

Hoewel de benoemde opties hoopvol zijn, is verder onderzoek naar de verschillende interventies die gewrichtsschade na een bloeding kunnen voorkomen of reduceren nodig om de translatie naar humane kliniek te kunnen maken. Om de pathogenese beter te begrijpen en eventueel nieuwe behandelingsdoelstellingen te ontdekken, is er meer kennis nodig over het effect van de interventies op (systemische) inflammatie en kraakbeenschade na een bloeding. Om dit verder te kunnen onderzoeken zijn er diverse experimenten nodig in een diermodel voor bloed-geïnduceerde gewrichtsschade, in zogenaamde hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J). Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor humane hemofilie.

### 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?

De doelstelling van dit onderzoeksproject is het verkrijgen van inzicht in de pathogenese van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Daarnaast wordt het effect onderzocht van verschillende interventies gericht op het voorkomen of behandelen van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Deze interventies zijn: ijzerchelatoren, IL1b-receptorantagonisten en IL4-10 synerkine. Translatie naar een betere behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade en het verminderen van de daarmee samenhangende morbiditeit in de kliniek staat hierbij voorop.

### 3.3 Belang

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

Ongeacht de oorzaak van de gewrichtsbloeding en, leidt bloed-geïnduceerde artropathie tot ernstige morbiditeit. Bij hemofiliepatiënten is het één van de meest voorkomende complicaties en heeft grote gevolgen. Ondanks het gebruik van stollingsfactorconcentraat komen gewrichtsbloedingen nog steeds voor (zie 3.1). Patiënten met bloed-geïnduceerde artropathie ervaren chronische pijn, bewegingsbeperkingen, invaliditeit en een verminderde kwaliteit van leven, vaak al op een zeer jonge leeftijd (minder dan 30 jaar) [14]. Uiteindelijk is vaak orthopedisch ingrijpen noodzakelijk [15,16]. Chirurgische procedures worden echter bemoeilijkt door de verminderde hemostase en zijn bovendien erg kostbaar. Derhalve is het nodig om nieuwe behandelingen van bloed-geïnduceerde artropathie te onderzoeken.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

#### Algemene opzet

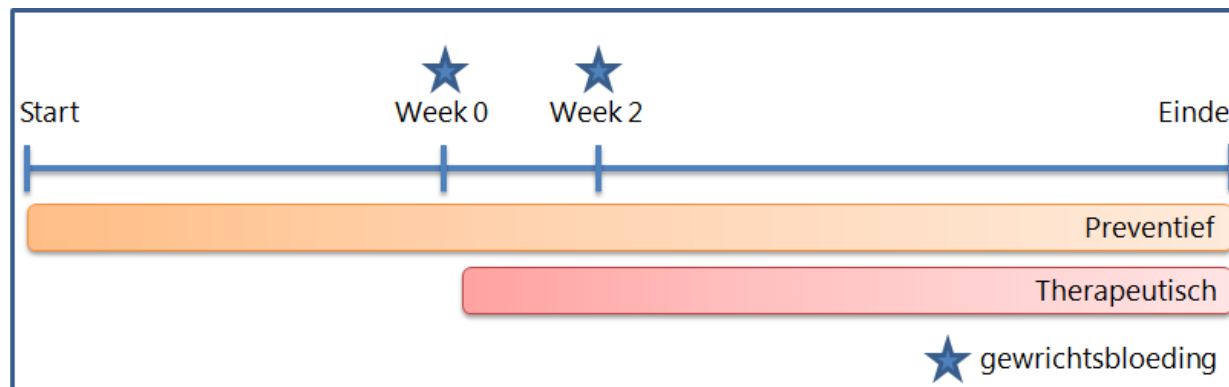
De verschillende interventies van dit project weerspiegelen verschillende mechanismen om in te grijpen in het proces van de bloed-geïnduceerde gewrichtsschade (zie figuur 2 bij 3.4.3). Per interventie zoals beschreven in 3.1 zullen een aantal experimenten worden opgezet. Bij die experimenten wordt de interventie eerst ingezet als preventieve maatregel en bij succes in therapeutische opzet getoetst. Hierbij zal er tevens een brede analyse naar de lokale en systemische effecten plaats vinden.

### Model

Hemartrose wordt geïnduceerd in zogenaamde hemofilie muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J), naar het muismodel van Hakobyan [11]. Er is gekozen voor deze vorm van trauma gezien het relatief beperkte ongerief voor het dier en de opgedane ervaring binnen onze onderzoeksgroep. Hemofiliemuizen vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie. De hemofilie muizen, die drie tot vier maanden oud zijn, worden geanestheseerd middels inhalatie anesthesie. Met een 30G naald wordt het kapsel van de rechter knie onder de patella gepuncteerd om een bloeding te induceren. De linker knie wordt niet aangedaan en geldt als een controle. Na twee weken wordt via dezelfde methode een tweede bloeding geïnduceerd.

Eerdere proeven in hemofiliemuizen door onze onderzoeksgroep uitgevoerd, hebben laten zien dat één gewrichtsbloeding zeer geringe gewrichtsschade geeft. Met dubbele inductie wordt er voldoende schade gecreëerd om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over het effect van de interventies (zie ook DEC 2013.II.04.046). Bovendien weerspiegelt dit meer de humane situatie, waarbij repeterende bloedingen nodig zijn voor de ontwikkeling van hemofilie artropathie.

In het geval dat de interventie preventief gegeven wordt, krijgen hemofiliemuizen de medicatie al *voor* de inductie van de gewrichtsbloeding. Eventueel wordt de interventie na de gewrichtsbloeding voor een bepaalde tijd voortgezet. In het geval dat de interventie therapeutisch wordt gegeven, wordt de interventie pas gestart *na* het induceren van de gewrichtsbloeding.



Figuur 1 – Tijdslijn experimenten Preventief en Therapeutisch

### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameter is histologie post mortem, waarbij de mate van kraakbeenschade en inflammatie van het synovium vastgesteld worden. Hiervoor worden de gevalideerde Valentino score [26] en Safranin O score [27] gebruikt. Secundaire uitkomstparameter is macroscopische inspectie, waarbij gekeken wordt naar de mate van zichtbare bloeding en gewrichtsdiameter. Tevens wordt bloed afgenomen middels een wangpunctie, waarbij verschillende inflammatoire parameters, biomarkers, genotype en ijzerstatus bepaald worden. Ook wordt bij de ijzerchelatie experimenten post-mortem histologisch onderzoek gedaan naar het ijzergehalte in de weefsels (onder andere hart, lever, milt).

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

De verschillende onderdelen van het project:

A) Interventie: ijzerchelator



- Preventief (behandelen met ijzerchelator alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
- Therapeutisch (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas ijzerchelator toegediend wordt)

B) Interventie: IL1b-receptor antagonist

- Preventief (behandelen met IL1b-receptor antagonist alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
- Therapeutisch (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas IL1b-receptor antagonist toegediend wordt)

C) Interventie: IL4-10 synerkine

- Preventief (behandelen met IL4-10 synerkine alvorens een gewrichtsbloeding te induceren)
- Therapeutisch (gewrichtsbloeding induceren, waarna pas IL4-10 synerkine toegediend wordt)

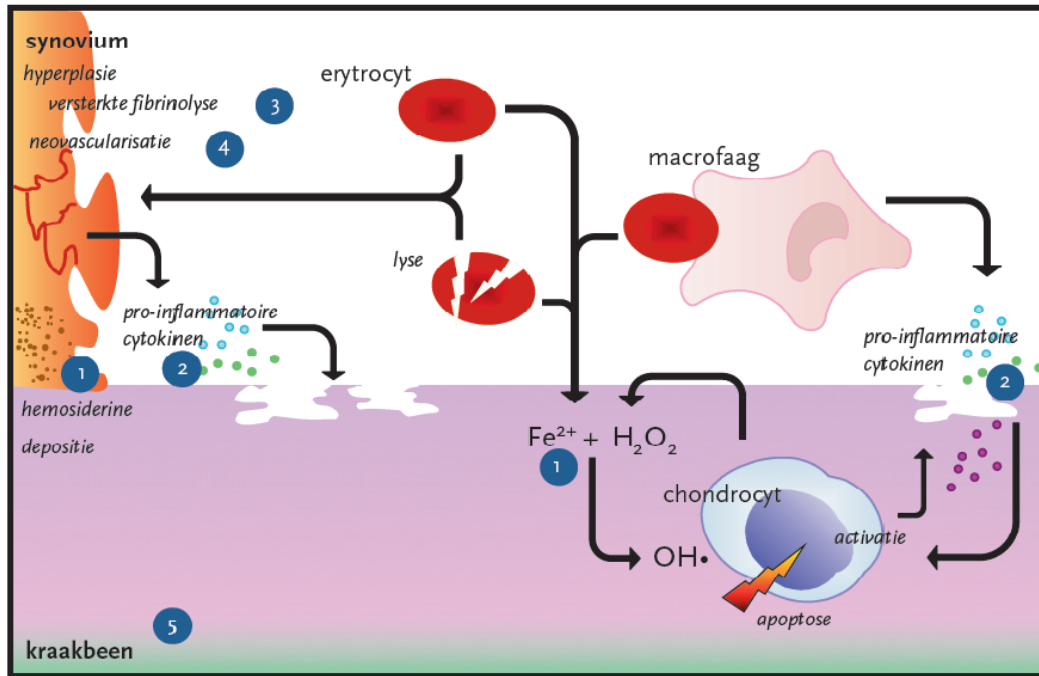
D) Fok met ongerief – hemofilie muizen

---

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

---

De pathogenese van bloed-geïnduceerde artropathie is complex. Op verschillende niveaus zou op dit proces ingegrepen kunnen worden. In onderstaand figuur [25] staat de pathogenese van bloed-geïnduceerde artropathie beschreven met mogelijke aangrijpingspunten voor potentiële nieuwe therapie. Vertaald naar onze studie grijpt interventie A (ijzerchelator) aan op nummer 1 en interventie B en C (IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) remmen de pro-inflammatoire cytokines van nummer 2.

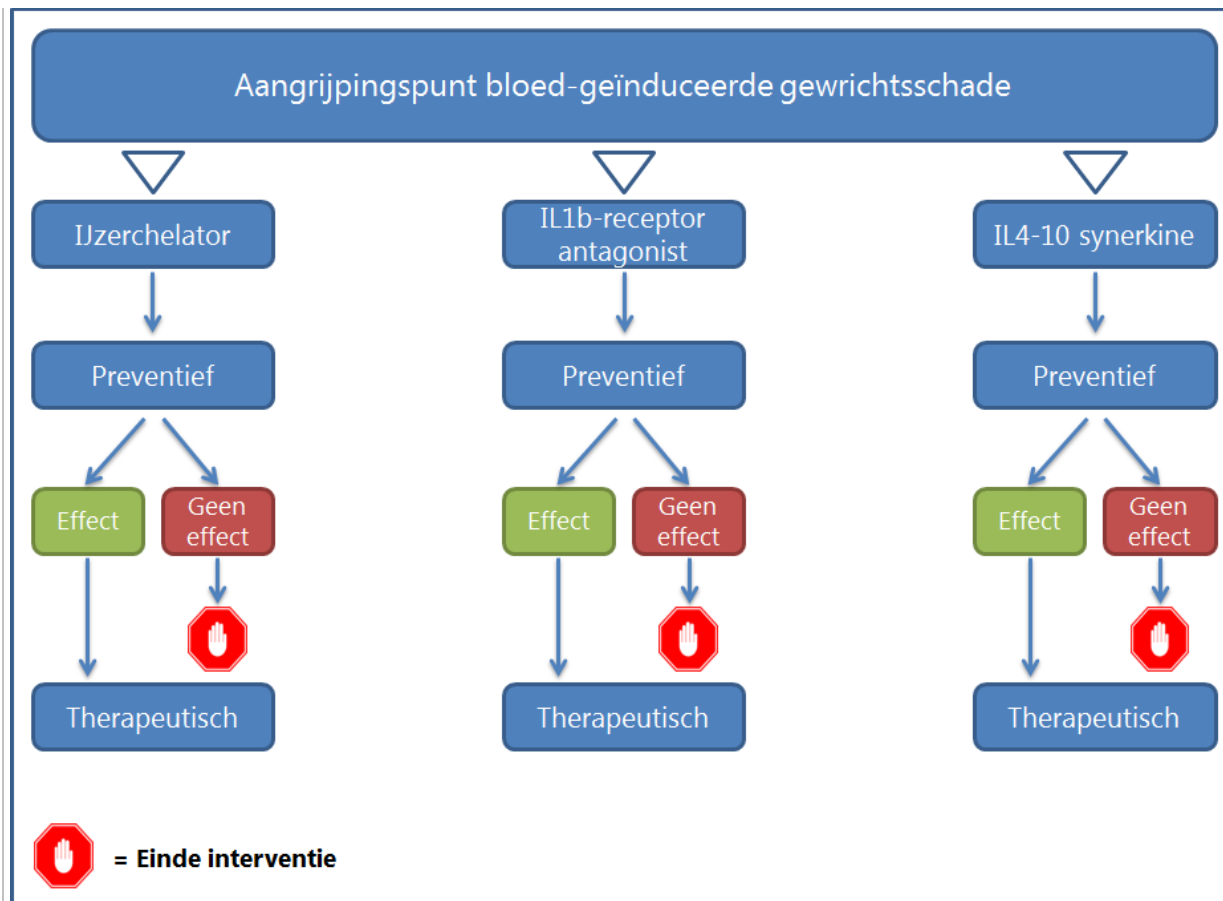


Figuur 2 - Pathogenese van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade en aangrijpingspunten voor potentiële nieuwe therapieën.

1: ijzerchelatie; 2: anti-inflammatoire therapie (IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine); 3: fibrinolysereimmers; 4: neoangiogeneseremmers; 5: kraakbeenregeneratie

Ons onderzoeksproject richt zich op ijzerchelatie en twee vormen van anti-inflammatoire therapie. In figuur 3 is de samenhang van de verschillende onderdelen van het project weergegeven. De experimenten die horen bij interventie A t/m C kunnen onafhankelijk van elkaar worden uitgevoerd. Allereerst wordt gekeken of de interventie effect heeft als het preventief gegeven wordt en daarmee bloedgeïnduceerde schade voorkomt (op basis van onze primaire uitkomstparameter, zie 3.4.1). Indien blijkt dat een interventie preventief onvoldoende effect heeft, wordt die tak gestopt en wordt de interventie in therapeutische opzet achterwege gelaten. De hypothese is dat als lange blootstelling aan de interventie (dus nog voor de inductie van gewrichtsschade) geen effect heeft, kortere blootstelling niet zinvol is. Bij een positieve bevinding wordt wel therapeutische toediening getoetst.

De beperkte beschikbare capaciteit maakt dat we moeten kiezen met welke interventie we beginnen. Als eerste willen we de effecten van ijzerchelatie bestuderen, mede omdat dit middel al klinisch wordt toegepast bij ziektebeelden als hemochromatose en ijzerstapeling door herhaalde bloedtransfusie. Bij succes kan dit de translatie naar de humane kliniek bevorderen. Indien ijzerchelatie niet het gewenste resultaat oplevert, switchen we naar een andere tak/interventie binnen dit project.



Figuur 3 – samenhang projectonderdelen

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Muismodel – Experimenten
2	Muismodel – Fok met ongerief
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](http://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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="1"/> | <input type="text" value="Muismodel - Experimenten"/> |

*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.

###### Experimentele aanpak

Dit onderzoek kijkt naar verschillende methoden om in te grijpen in het proces van de schade die ontstaat na een gewrichtsbloeding. Tijdens de experimenten wordt gekeken naar het effect van de interventies (ijzerchelator, IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) op bloed-geïnduceerde artropathie. Bij de experimenten wordt de interventie eerst ingezet als preventieve maatregel, om vervolgens bij succes therapeutisch te worden getoetst. Hierbij zal tevens een brede analyse naar de lokale en systemische effecten plaats vinden.

### Uitkomstparameters

De primaire uitkomstparameter is histologie post-mortem, waarbij de mate van kraakbeenschade en inflammatie van het synovium vastgesteld wordt. Hiervoor worden de gevalideerde Valentino score [26] en Safranin O score [27] gebruikt. De resultaten worden blind beoordeeld door twee onderzoekers. Secundaire uitkomstparameter is macroscopische inspectie, waarbij gekeken wordt naar de mate van zichtbare bloeding en de gewrichtsdiameter. Tevens wordt bloed afgenomen middels een wangpunctie, waarbij verschillende inflammatoire parameters, biomarkers, genotype en ijzerstatus bepaald worden. Ook wordt bij de ijzerchelatie experimenten post-mortem histologisch onderzoek gedaan naar het ijzergehalte in de weefsels (onder andere hart, lever, milt).

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.

### Behandelingsduur

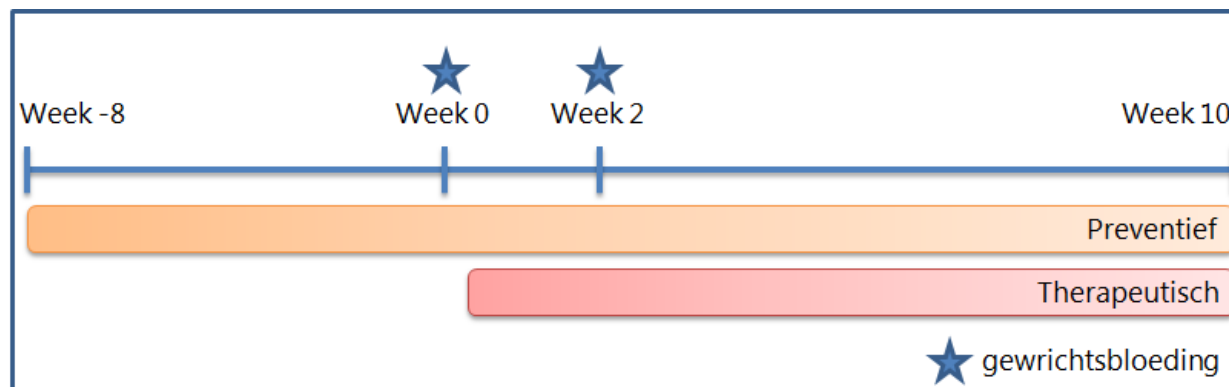
#### *Preventief*

Bij deze experimenten worden de hemofiliemuizen gerandomiseerd tussen de interventie of placebo. De muizen worden behandeld met de interventie tot maximaal 8 weken voor het induceren van de gewrichtsbloeding. In week 0 en week 2 wordt een gewrichtsbloeding geïnduceerd. De behandeling wordt gecontinueerd voor een periode van 10 weken na het induceren van de gewrichtsbloeding. De maximale duur van follow-up in het experiment kan variëren op basis van voortschrijdend inzicht (zowel korter als langer) en wordt specifiek gedefinieerd per experiment.

#### *Therapeutisch*

De hemofiliemuizen worden gerandomiseerd tussen de interventie of placebo. Er worden gewrichtsbloedingen geïnduceerd, waarna op een later moment gestart wordt met de interventie. Deze behandeling wordt voor een periode van 10 weken voortgezet. De frequentie van behandeling en maximale duur van follow-up in het experiment kan variëren op basis van voortschrijdend inzicht (zowel korter als langer) en zal per experiment worden gedefinieerd.

Bovenstaande opzet wordt verduidelijkt in figuur 1.



Figuur 1 – Tijdslijn experimenten Preventie en Therapeutisch

## Behandeling

De verschillende interventies worden op verschillende wijze toegediend. De ijzerchelator deferasirox wordt opgelost in het drinkwater ('placebo': drinkwater zonder toevoeging) in een dosering van 30 mg/kg (op basis van eerdere muismodel [21], mocht er sprake zijn van voortschrijdend inzicht wordt dit aangepast). Deferasirox wordt systemisch toegepast in de mens. De meest voorkomende bijwerkingen bij de mens zijn stijging van de plasma creatinine en gastro-intestinale klachten. In de literatuur wordt beschreven dat de ijzerchelator deferasirox een anemie kan verergeren bij reeds bestaande hematologische aandoeningen. De hemofiliemuizen hebben geen onderliggende hematologische aandoening of reeds bestaande anemie, dus lopen hier minder kans op. Om een eventuele anemie ten gevolge van de ijzerchelatie goed in beeld te brengen, zullen we bij de geplande bloedafnames ook het hemoglobine, MCV en ferritine bepalen [28]. Tevens wordt post-mortem histologisch onderzoek gedaan naar het ijzergehalte in de weefsels (onder andere hart, lever, milt). Hoewel ferritine een acuut-fase eiwit is, verwachten we geen verstoring van de bepaling omdat de bloedafnames meerdere weken na het 'acute moment' (de gewrichtsbloedingen) zullen plaatsvinden. In een eerdere proof-of-concept studie (DEC 2009.III.08.067) waarbij deferasirox twee maanden aan hemofiliemuizen is gegeven, zijn plasma ferritine levels bepaald. Hierbij is een gemiddeld level van 823 ng/ml  $\pm$ 56 gemeten in de deferasiroxgroep (controlegroep 1220 ng/ml  $\pm$ 114). In beide groepen zijn geen opvallende bijwerkingen gezien.

IL4-10 synerkine en IL1b-receptor antagonist worden intra-articulair gegeven (placebo: intra-articulaire injectie met alleen oplosmiddel). De voorgestelde dosering IL4-10 synerkine is 7pmol/3 $\mu$ l. Mocht er sprake zijn van voortschrijdend inzicht, wordt dit aangepast. De dosering van IL1b wordt nader bepaald op basis van *in vitro* werk / literatuuronderzoek. Bij deze middelen verwachten we geen systemische bijwerkingen. Lokaal kan er een lichte reactie op de intra-articulaire injectie ontstaan.

Hemofilie muizen krijgen, in tegenstelling tot de humane situatie, geen spontane gewrichtsbloedingen. Daarom worden op een gecontroleerde manier gewrichtsbloedingen geïnduceerd naar het muismodel van Hakobyan [11]. De hemofiliemuizen worden verdoofd middels inhalatie anesthesie. Met een 30G naald wordt het kapsel van de rechter knie onder de patella gepuncteerd om een bloeding te induceren. De linker knie wordt niet aangedaan en geldt als een controle. Voor de ontwikkeling van hemofilie artropathie zijn repeterende bloedingen nodig. Om zeker te weten dat het gewricht voldoende blootgesteld is aan bloed, wordt na twee weken via dezelfde methode een tweede kniebloeding geïnduceerd. De muizen worden gedood door cervicale dislocatie.

Er is gekozen voor dit muismodel vanwege het relatief beperkte ongerief voor het dier en omdat eerder wetenschappelijk onderzoek gebruik maakte van dit model waardoor resultaten te vergelijken zijn. Bovendien is er ruime ervaring mee opgedaan binnen onze onderzoeksgroep.

---

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

Onze primaire outcome is de Valentino score, een gevalideerde histologische score voor de mate van gewrichtsschade ten gevolge van bloed. Deze score is een categorische score van 0 tot 10. Deze score zal door 2 personen worden uitgevoerd, wat de mogelijkheid geeft tot maximaal 20 categorische variabelen. In overleg met onze biostatisticus, eveneens verbonden aan het Julius centrum Utrecht, is een algemene vuistregel dat een categorische score van meer dan 5 punten als een continue variabele mag worden beschouwd. Mede op basis van deze vuistregel en onderstaande aannames, die onder andere gebaseerd zijn op onze vorige experimenten met dit model, komen we uit op de volgende algemene sample-size berekening:

Op basis van eerder gedane experimenten is de verwachting dat een minimale effect-size van 0.8 (groot; effect size tussen behandelde poot versus placebo behandelde poot) als klinisch relevant gezien kan worden. Op basis van een alpha van 0.05, een power van 0.8 waarbij 2 onafhankelijke groepen vergeleken worden op 1 primaire outcome, is de verwachting dat groepen van 26 dieren nodig zijn per experiment om een relevant verschil aan te kunnen tonen (berekend met G-power).

**t tests** - Means: Difference between two independent means (two groups)

**Analysis:** A priori: Compute required sample size

**Input:**

Tail(s)	=	Two
Effect size d	=	0.8
$\alpha$ err prob	=	0.05
Power (1- $\beta$ err prob)	=	0.8
Allocation ratio N2/N1	=	1

**Output:**

Noncentrality parameter $\delta$	=	2.8844410
Critical t	=	2.0085591
Df	=	50
Sample size group 1	=	26
Sample size group 2	=	26
Total sample size	=	52
Actual power	=	0.8074866.

Op basis van vorige experimenten verwachten we een uitval van 10%. Daarmee is de verwachting dat we groepen van 29 dieren nodig hebben. Het gehele project is te groot om logistiek te kunnen hanteren, dus zullen de experimenten gefaseerd worden uitgevoerd en zal per fase bekeken worden of voortzetting van het experiment zinvol is (zie projectvoorstel 3.4.3). Voor de precieze aantallen zal er per experiment een sample size analyse uitgevoerd worden.

## B. De dieren

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

Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J) worden verkregen uit het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Dit zijn genetisch gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie en zijn daarmee een uniek model voor het bestuderen van bloedgeïnduceerde artropathie. De muizen vertonen geen spontane bloedingen (en hebben dus nog geen gewrichtsschade opgelopen), waardoor het model zich leent voor het controleerbaar induceren van gewrichtsbloedingen. Voor de experimenten worden dieren gebruikt tussen de 3 en 4 maanden oud en zowel mannetjes als vrouwtjes kunnen worden ingezet.

De dieren worden gefokt in het Gemeenschappelijk Dieren Laboratorium (GDL) van de Universiteit Utrecht. Hieronder volgt de uitleg over de benodigde aantallen.

*Experimenten:* Per interventie worden er twee type experimenten gedaan (preventief en therapeutisch). Elk type experiment vereist twee groepen: een interventie en placebo groep. De verwachting is dat er per groep 29 dieren nodig zijn. Daarmee komt het verwachte aantal op 348 dieren (3 interventies x 2 type experimenten x 2 groepen per experiment x 29 = 348 dieren).

*Fok:* De dieren worden per experiment gefokt. Voor één experiment zijn 58 dieren nodig en daarvoor worden 18 fokpaartjes gebruikt. De fokmannen worden ingezet in het experiment en zijn verdisconteerd in de bovenstaande 348 dieren. Blijven over de fokvrouwtjes = 3 interventies x 2 type experimenten x 18 = 108 dieren (zie bijlage II 2.B.).

*Totaal:* Het totale aantal komt op 348 + 108 = 456 dieren.



De motivatie voor de inzet van proefdieren ligt in het feit dat *in vitro* experimenten een beperkte afspiegeling vormen van de *in vivo* situatie bij zo'n complexe pathogenese als bloed-geïnduceerde artropathie. Er zijn geen alternatieven voor handen. Humane studies bij hemofiliepatiënten naar dit onderwerp zijn ethisch en technisch niet haalbaar (zie D).

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Proeven *in vitro* vormen een beperkte afspiegeling van de omstandigheden *in vivo* bij zo'n complex proces als het ontstaan van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade. Bovendien willen we het effect van verschillende methodes bestuderen op het niveau van het gewricht zelf, maar ook in relatie met het lichaam als geheel. Er zijn geen alternatieve modellen voor handen (search: Pubmed, Go3R). Hemofilie in hemofilie A muizen gedraagt zich als hemofilie in de mens, waardoor de dieren uitermate geschikt zijn voor de experimenten. Humane studies op dit onderwerp bij hemofiliepatiënten zijn ethisch niet haalbaar. Allereerst hebben hemofiliepatiënten stollingsfactoren tot hun beschikking, wat interfereert met de studieopzet om het potentiële effect van de interventies te onderzoeken. Het is niet ethisch om patiënten deze stollingsfactoren te onthouden. Daarnaast is een gewrichtsbloeding in hemofiliepatiënten niet te voorspellen, laat staan in welk gewricht. Daarmee vervalt de optie dat de patiënt zelf zijn eigen controle kan zijn. Bovendien is het voor hemofiliepatiënten lastig een gewrichtsbloeding te onderscheiden van een flare-up van hun hemofilie artropathie, wat de afweging om te starten met de interventie bemoeilijkt.

Om het effect van de interventie op weefselniveau in detail te kunnen onderzoeken, is histologisch onderzoek de primaire uitkomstmaat. Het is niet ethisch om bij levende patiënten materiaal voor histologisch onderzoek te verkrijgen. Een kraakbeen biopt zou het toch al aangedane gewricht verder verslechteren.

Vermindering: Hoewel hemofilie in de mens vrijwel alleen bij mannen voorkomt, gebruiken we voor deze experimenten zowel mannetjes als vrouwtjes omdat het genotype dat toelaat. Het gebruik van beide geslachten draagt bij aan het verminderen van het fokoverschot.

Op basis specifieke sample size berekeningen zal per experiment het exacte aantal dieren berekend worden. De verwachting is dat 29 dieren per groep nodig zijn om met voldoende zekerheid een uitspraak te kunnen doen over een specifieke interventie. Daarbij wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door traumagerelateerde bloedingen ingecalculeerd moet worden. Het gehele project is te groot om logistiek te kunnen hanteren, dus zullen de experimenten gefaseerd worden uitgevoerd en zal per fase bekeken worden of voortzetting van het experiment zinvol is (zie

projectvoorstel 3.4.3).

*In vitro* experimenten en/of literatuur studie vormen de basis van de doseringen die gebruikt worden in de experimenten, zodat we zo gericht mogelijke dosering kunnen toepassen. Deze voorstudies zorgen er dus voor dat het aantal dieren kan worden verminderd.

Verfijning: Er zijn diverse dieren waarin hemofilie spontaan of via genetische modificatie voorkomt. Zo zijn er hond en muismodellen, die bruikbaar zijn voor preklinische studies *in vivo*. Modellen in ratten, schapen en duiven zijn minder uitgewerkt.

Het voordeel van het muismodel is dat hemofiliemuizen, in tegenstelling tot de hond, minder de neiging hebben tot spontaan bloeden in weefsels of gewrichten. Dit geeft een betere controle over de experimentele condities. Verder is er eerder wetenschappelijk onderzoek in deze hemofiliemuizen gedaan, waardoor het vergelijken van resultaten gemakkelijker is. Daarnaast is er reeds ruime ervaring met dit muismodel in onze onderzoeksgroep opgedaan en is geleerd van eerdere welzijnsevaluaties. Een voorbeeld is dat vrouwtjes maximaal 2 nestjes mogen krijgen, omdat er na meerdere nestjes een grotere kans op overlijden leek te zijn. Sinds het instellen van deze maatregel is er geen partusgerelateerde problematiek van fokvrouwen meer voorgekomen.

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.

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest. Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressie-gerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest. Bij alle dieren wordt er extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerd trauma.

De dieren worden verdoofd voor het induceren van de gewrichtsbloeding en het inspecteren van het gewricht.

## 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.

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest, maar bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressiegerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De dieren worden geanestheseerd voorafgaand aan de handelingen als inspectie van de gewrichtsdiameter, bloedafname en gewrichtspuncties.

In eerdere experimenten van onze groep is de mate van ongerief na een gewrichtspunctie zeer gering gebleken, derhalve wordt geen additionele pijnstilling gegeven.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Ten gevolge van het genotype kans op wekedelen bloedingen; agressie- en/of traumagerelateerde bloedingen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak ligt in het genotype van de muis; de stollingsfactor VIII deficiëntie.

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

Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannelijke dieren vanaf de leeftijd van zes weken alleen gehuisvest. Bij alle dieren wordt extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerde bloedingen.

### 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.

Humane eindpunten specifiek voor deze studie:

- Ernstige verwondingen / wekeden bloedingen door agressie of trauma (Hemofiliemuizen bloeden in principe niet spontaan).
- Intra-articulaire ontsteking ten gevolge van lokale behandeling bij interventie arm B en C (kans hier op klein maar mogelijk).

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

Op basis van welzijnsevaluatie 2012 en eerdere ervaringen: 10%.

### **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.

Ingeschat ongerief gedurende de studie:

- Risico op spontane danwel trauma/agressie gerelateerde bloedingen als gevolg van genotype: licht
- Induceren gewrichtsbloeding x 2: licht
- Bloedafname: licht
- Intra-articulaire injectie / orale toediening via drinkwater: licht
- Anesthesie voor de ingrepen: licht

Cumulatief wordt het risico ingeschat op matig.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Histologie postmortem is het primaire eindpunt van deze proef.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef                                |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Fok met ongerief"/> |

*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.

Dit onderzoek kijkt naar verschillende methoden om in te grijpen in het proces van de gewrichtsschade die ontstaat na een bloeding. Tijdens de experimenten wordt gekeken naar het effect van drie interventies (ijzerchelator, IL1b-receptor antagonist en IL4-10 synerkine) op bloed-geïnduceerde artropathie. Om dit onderzoek uit te voeren maken we gebruik van zogenaamde hemofilie A muizen (B6;129S4-F8-tm1Kaz/J). Dit zijn genetische gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno-en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie. De fokpaartjes worden verkregen via het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Deze bijlage omschrijft de opzet voor een fok met ongerief.

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.

Op basis van de sample size berekening zoals beschreven in bijlage I verwachten we 58 muizen per experiment (2 groepen van 29 dieren) nodig te hebben en in totaal zo'n 348 dieren. Om dit benodigde aantal proefdieren te verkrijgen word er een fok met de B6;129S4-F8-tm1Kaz/J muizen opgezet. Er zal worden gestart met 9 fokouders: 3 mannelijke en 6 vrouwelijke proefdieren.

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

Gezien de grootte van de groepen en de beperkte capaciteit zullen de beoogde experimenten gefaseerd uitgevoerd worden, waardoor er per experiment de benodigde nakomelingen gefokt worden. Hierdoor hoeven de muizen niet onnodig lang te zitten. De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd. Dit heeft als voordeel dat er per fase wordt gekeken of het voortzetten van het experiment zinvol is, wat onnodig gebruik van proefdieren kan voorkomen. Voor de uitgebreide statistische strategie verwijzen wij u naar bijlage I paragraaf 2A.

## B. De dieren

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

Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J) worden verkregen uit het Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, Verenigde Staten. Dit zijn genetisch gemodificeerde muizen met een knock-out voor bloedstollingsfactor VIII. Mannelijke dieren zijn heterozygoot en vrouwelijke dieren zijn homozygoot. Deze dieren vormen een geno- en fenotypisch model voor de humane hemofilie situatie en zijn daarmee een uniek model voor het bestuderen van bloed-geïnduceerde artropathie. Voor onze experimenten hebben we in totaal 348 dieren nodig voor in totaal 6 experimenten. We zullen de dieren fokken per experiment en het experiment zelf ook gefaseerd uitvoeren met oog op de logistiek.

Er wordt gestart met 9 fokouders: 3 mannelijke dieren en 6 vrouwelijke proefdieren. Gegevens muis:

- Geslachtsrijp 5 weken
- Fokrijp 8-10 weken
- Draagtijd 19 (18-21) dagen
- Speenleeftijd 21-28 dagen
- Levensverwachting 1-2 jaar
- Gemiddeld 5 nakomelingen per kruising
- Aantal nestjes per vrouwtje: maximaal 2 (om partus gerelateerde problematiek te voorkomen)

Op basis van bovenstaande gegevens en eerdere ervaringen hebben we 18 fokpaartjes nodig om het benodigde aantal dieren voor één experiment (58 dieren) te fokken. De 18 fokvrouwtjes worden na de fok afgevoerd. De fokmannen kunnen deelnemen aan het experiment. Voor dit onderzoeksproject zijn in totaal dus  $6 \times 18 = 108$  fokvrouwen nodig. Per experiment zal een nieuwe fokopzet gemaakt worden en het aantal fokpaartjes zo nodig worden aangepast.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

---

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

Nee

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

---

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Vervanging: Proeven *in vitro* vormen een beperkte afspiegeling van de omstandigheden *in vivo* bij zo'n complex proces als het ontstaan van bloedgeïnduceerde gewrichtsschade. Bovendien willen we het effect van verschillende methodes bestuderen op het niveau van het gewricht zelf, maar ook in relatie met het lichaam als geheel. Er zijn geen alternatieve modellen voor handen. Hemofilie in hemofilie A muizen gedraagt zich als hemofilie in de mens, waardoor de dieren uitermate geschikt zijn voor de experimenten. Humane studies op dit onderwerp bij hemofiliepatiënten zijn ethisch niet haalbaar.

Vermindering: Hoewel hemofilie in de mens vrijwel alleen bij mannen voorkomt, gebruiken we voor deze experimenten zowel mannetjes als vrouwtjes omdat het genotype dat toelaat. Daarnaast kunnen de fokmannetjes ook ingezet worden in het experiment zelf. Het gebruik van beide geslachten en de fokmannetjes in het experiment dragen bij aan het verminderen van het fokoverschot en de hoeveelheid dieren.

We berekenen op basis van specifieke sample size berekeningen per experiment het exacte aantal dieren. Bij de berekening wordt rekening gehouden met de aard van de ziekte, waarbij een verlies van dieren door traumagerelateerde bloedingen ingecalculeerd moet worden. De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd. Dit heeft als voordeel dat er per fase wordt gekeken of het voortzetten van het experiment zinvol is, wat onnodig gebruik van proefdieren kan voorkomen (zie projectvoorstel 3.4.3). Daarnaast worden de dieren ook per experiment gefokt, zodat de muizen niet onnodig lang zitten.

Verfijning: Er zijn diverse dieren waarin hemofilie spontaan of via genetische modificatie voorkomt. Zo zijn er hond en muismodellen, die bruikbaar zijn voor preklinische studies *in vivo*. Modellen in ratten, schapen en duiven zijn minder uitgewerkt.

Het voordeel van het muismodel is dat hemofiliemuizen, in tegenstelling tot de hond, minder de neiging hebben tot spontaan bloeden in weefsels of gewrichten. Dit geeft een betere controle over de experimentele condities en de fok. Daarnaast is er reeds ruime ervaring met het fokken van deze muizen in onze onderzoeksgroep opgedaan en is geleerd van eerdere welzijnsevaluaties. Een voorbeeld is dat vrouwtjes maximaal 2 nestjes mogen krijgen, omdat er na meerdere nestjes een grotere kans op overlijden leek te zijn. Sinds het instellen van deze maatregel is er geen oversterfte van de fokvrouwen meer voorgekomen.

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.

Mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest. Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressie-gerelateerd trauma. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest. Bij alle dieren wordt er extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerd trauma.

Uit onze ervaring met het fokken van hemofiliemuizen blijkt dat er geen partusgerelateerde uitval ontstaat als vrouwtjes maximaal twee nestjes krijgen. Dit hebben we dan ook opgenomen in ons fokprotocol.

---

## 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.

Fokmannen worden solitair gehuisvest. De overige mannelijke dieren worden in principe in groepsverband gehuisvest, maar bij tekenen van onderlinge agressie worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Dit gezien de verhoogde bloedingskans en de mogelijkheid van agressiegerelateerd trauma worden mannetjes alleen gehuisvest vanaf de leeftijd van zes weken. Vrouwelijke dieren worden in groepsverband gehuisvest.

### 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?

Er is een hoger risico op wekedelen bloedingen en agressie- en/of trauma gerelateerde bloedingen. Uit onze ervaring blijkt dat er geen partusgerelateerde uitval gezien wordt als vrouwtjes maximaal twee nestjes krijgen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak voor de verhoogde kans op wekedelen bloedingen bij agressie of trauma is de stollingsfactor VIII deficiëntie, ook bij de homozygote vrouwtjes.

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

Bij tekenen van onderlinge agressie worden mannelijke dieren vanaf de leeftijd van zes weken alleen gehuisvest. Bij alle dieren wordt extra beddingsmateriaal toegevoegd ter voorkoming van trauma- en agressiegerelateerde bloedingen. Vrouwtjes krijgen maximaal twee nestjes.

### **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.

Humane eindpunten specifiek voor de fok:

- Ernstige verwondingen / wekedelen bloedingen door agressie of trauma (Hemofiliemuizen bloeden in principe niet spontaan).

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

Op basis van welzijnsevaluatie 2012 en eerdere ervaringen: 10%.

### **K. Classificatie van ongerief**

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

Het ongerief ten gevolge van het genotype wordt ingeschat als licht.

## **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 fokmannetjes worden ingezet in de experimenten. De fokvrouwtjes worden na de fok (maximaal 2 nestjes) gedood omdat uit eerder een oversterfte van fokvrouwtjes met > 2 nestjes werd gezien.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016451

**Uw referentie**

**Bijlagen**

1

Datum 7 april 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 26 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade" met aanvraagnummer AVD115002016451. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 23 maart 2016 hebben wij bij de behandeling van uw aanvraag geconcludeerd dat de aanpassingen en wijzigingen naar aanleiding van het DEC advies niet waren doorgevoerd in de door u ingediende documenten. Op ons verzoek heeft u op 23 maart 2016 de juiste versie van de documenten ingediend.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade" starten. De vergunning wordt afgegeven van 7 april 2016 tot en met 1 april 2021. De startdatum van uw project wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Aanvullend stelt de CCD twee algemene voorwaarden om te voldoen aan datgene wat voort komt uit artikel 10a. van de wet.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 februari 2016. 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. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. In aanvulling hierop worden de twee algemene voorwaarden gesteld die aan meerjarige projecten worden verbonden.

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

**Datum**  
7 april 2016

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016451

### **Bezwaar**

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

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

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


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

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

### **Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

### **Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: UMC Utrecht  
Adres: postbus 12007  
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 april 2016 tot en met 1 april 2021, voor het project "Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade" met aanvraagnummer AVD115002016451, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 februari 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 23 maart 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 23 maart 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 24 februari 2016, ontvangen op 26 februari 2016;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag zoals ontvangen op 23 maart 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Muismodel - Experimenten	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J)	348	Matig
Fok met ongerief	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Hemofilie A muizen (B6;129S4-F8tm1Kaz/J) fokvrouwen	108	Licht

### Algemene voorwaarden

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

- 1) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen in afstemming met de IvD.
- 2) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.  
Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

# Weergave wet- en regelgeving

## Dit project en wijzigingen

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

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

## Verzorging

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

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

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

## Pijnbestrijding en verdooving

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

**Datum**

7 april 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD115002016451

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

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

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

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



**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 19 april 2016 16:25  
**Aan:** 'dec-utrecht@umcutrecht.nl'  
**Onderwerp:** terugkoppeling besluit AVD115002016451

Geachte leden van DEC Utrecht,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning aangeboden waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project "Preventie en behandeling van bloed-geïnduceerde gewrichtsschade" met aanvraagnummer AVD115002016451, uw interne code 2015.II.550.041.

De CCD heeft uw advies gevolgd en besloten het project te vergunnen. Aan de vergunning zijn twee algemene voorwaarden verbonden om te voldoen aan datgene wat voortkomt uit artikel 10a van de wet.

De aanvrager is van het besluit op de hoogte gebracht. De CCD dankt u voor het uitbrengen van uw advies,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

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