

05 APR. 2016

Centrale Commissie Dierproeven



ARD 11400 2016 501

Aanvraag**Projectvergunning Dierproeven**
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11400
		<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	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC) Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	64156338
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	de Boelelaan 1117
		Postbus	-
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	NL07DEUT0549310002
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting VU-VUmc
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <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 | 1 - 5 - 2016 |
| Einddatum | 1 - 5 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------------------|
| Naam DEC | DEC-VU-VUMC |
| Postadres | Amsterdam The Netherlands |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 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
-


6 Ondertekening


- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

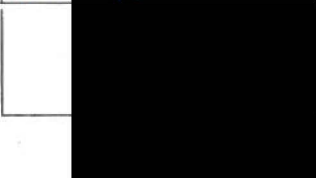
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Amsterdam

Datum 31 - 01 - 2016

Handtekening 



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- 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
- 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 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Goed werkende spieren zijn noodzakelijk voor het dagelijks leven: problemen in skeletspieren (de

ademhalingsspier is een pregnant voorbeeld) kunnen leiden tot verslechtering van de kwaliteit van leven en een vroegtijdige dood. Verminderde spierfunctie kan zowel erfelijk als verworven zijn. Een voorbeeld van een erfelijke skeletspierziekte is nemaline myopathie. Dit is de meest voorkomende aangeboren spierziekte binnen de groep van aandoeningen waarin verstoringen in het *samentrekken* van de spier leiden tot spierzwakte (incidentie 1:50.000). Bij nemaline myopathie leiden mutaties in genen die coderen voor eiwitten in de sarcomeer – de kleinste contractiele eenheid in een spier – tot spierzwakte. De moleculaire mechanismen waardoor mutaties leiden tot spierzwakte zijn onvoldoende bekend en daarom is een specifieke en gerichte behandeling van patiënten nu niet mogelijk. Naast het vergroten van het inzicht in het verloop van de ziekte, willen we ook een medicijn testen die de sarcomeerfunctie verbetert.

Het project heeft zowel een fundamenteel als een translationeel karakter. Om spierfunctie van patiënten te verbeteren, is het allereerst van belang de mechanismen onderliggend aan spierzwakte in kaart te brengen. Inzicht verwerven in de pathofysiologie van aangeboren spierzwakte is de fundamentele kant van dit project. Het translationele deel betreft het testen van een nieuw en veelbelovend medicijn – een spieractivator- om spierkracht te verhogen.

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?

Algemeen doel: inzicht verwerven in de pathofysiologie van spierzwakte en het testen van een nieuw medicijn.

In dit project willen we meer inzicht vergaren over de onderliggende mechanismen van spierzwakte bij patiënten met nemaline myopathie. Met dit project willen we de volgende onderzoeksvragen beantwoorden;

1. Wat is de pathofysiologie van (1) de meest voorkomende vorm van nemaline myopathie en (2) de meest recent gediagnostiseerde vorm van nemaline myopathie? Waar bevinden de betrokken eiwitten zich en wat is hun rol in het genereren van spierkracht?
Van zowel het meest voorkomende eiwit dat is aangedaan bij nemaline myopathie als het meest recent gediagnostiseerde eiwit is nauwelijks bekend waar de eiwitten zich bevinden in de spiercel en welke rol ze spelen bij de ontwikkeling van spierkracht. Daarom begrijpen we niet hoe genetische fouten die betrekking hebben op deze eiwitten kunnen leiden tot spierzwakte. Het is van essentieel belang om de lokalisatie en de rol van deze eiwitten in kaart te brengen om het ziektemechanisme te begrijpen en aangrijpingspunten voor therapieën te ontwikkelen.
2. Wat is het effect van acute en chronische blootstelling aan een spieractivator op spierfunctie in vijf nemaline myopathie muismodellen ?

Haalbaarheid

Onze afdeling heeft ruime ervaring met de voorgestelde experimenten en de benodigde infrastructuur, getuige meerdere publicaties in internationaal gerenommeerde tijdschriften. Ook zijn er voldoende financiële middelen om personeel aan te stellen en apparatuur aan te schaffen om de geplande experimenten uit te voeren.

3.3 Belang

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

Dit project heeft als doel meer inzicht te krijgen in aangeboren verstoringen in skeletspierfunctie en om nieuwe behandelingsmethoden te onderzoeken.

Spierzwakte is een grote belemmering in het dagelijks leven van mensen met een spierziekte, in de revalidatie en bij ouderen. Bij een groot aantal patiënten met een spierziekte leidt falen van de ademhalingspier (het diafragma) zelfs tot een vroegtijdige dood. Voor patiënten met nemaline myopathie – de meest voorkomende aangeboren spierafwijking met verstoorde contractie-eiwitten – is momenteel geen medicijn beschikbaar. Het is onze verwachting dat het medicijn dat we gaan testen, een spieractivator, de kwaliteit van leven van deze patiënten verbetert. We komen met de geplande experimenten veel te weten over de werking van een spieractivator op intacte spierfunctie in het gehele lichaam. De bevindingen zullen niet alleen van toepassing zijn op patiënten met nemaline myopathie, maar ook mensen met afgenomen spierfunctie door andere oorzaken, bijvoorbeeld een verminderde spieractivatie bij veroudering en diverse andere spierziektebeelden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het algemene doel van deze projectaanvraag is om meer inzicht te verkrijgen in de onderliggende mechanismen van verminderde skeletspierfunctie van patiënten met nemaline myopathie en om een potentieel medicijn te testen. Op deze manier willen we de kwaliteit van leven van de patiënten met nemaline myopathie verbeteren. Dit wordt op de volgende manier onderzocht.

Pathofysiologie

Nemaline myopathie is de meest voorkomende aangeboren spierziekte binnen de groep van aandoeningen waarin verstoringen in het samentrekken van de spier leiden tot spierzwakte. Vandaag de dag zijn we op de hoogte van 10 genen die betrokken zijn bij het ontstaan van nemaline myopathie. Er is echter nog geen medicijn voor handen. Om het inzicht in twee veelvoorkomende vormen van nemaline myopathie te vergroten, hebben we in twee verschillende muismodellen het betrokken eiwit gelabeld met een fluorescente probe. Van deze twee eiwitten, die de oorzaak zijn in het ontstaan van de ziekte, is nauwelijks bekend welke rol ze precies spelen. Door de eiwitten zichtbaar te maken middels fluorescentie, komen we te weten (1) waar de eiwitten zich bevinden in de cel, en (2) bij welke processen ze betrokken zijn. De skeletspier bestaat uit een zeer vernuftig raderwerk dat exact op elkaar is ingesteld om de spieren in beweging te brengen. De preciese plek van een eiwit in dit raderwerk voorspelt de rol die het eiwit speelt bij het genereren van kracht. Van twee eiwitten die vaak verstoord zijn bij nemaline myopathie, weten we niet precies waar deze eiwitten zich bevinden in het raderwerk. Als we deze informatie kunnen verkrijgen middels de fluorescente probe waarmee we de desbetreffende eiwitten kunnen labelen, vergroot dat ons inzicht in waarom deze spieren met aangedane eiwitten minder kracht kunnen leveren. Ook levert deze informatie hiermee aangrijpingspunten op voor therapieën om de spierkracht te herstellen. Zo vergroten we het inzicht in de pathofysiologie van nemaline myopathie.

Testen medicijn

Onlangs hebben we op *geïsoleerde individuele spiercellen* van nemaline myopathie patiënten een veelbelovende stof getest, een spieractivator, die de spierkracht aanzienlijk verbeterde. Om de stap te maken naar het testen van deze stof in nemaline myopathie patiënten is meer preklinisch werk noodzakelijk. We weten namelijk nog niet wat het effect van de spieractivator is op *intacte spieren* in nemaline myopathie. We verwachten dat de muizen bij gebruik van een spieractivator meer spierkracht kunnen leveren bij submaximale inspanning, en zuiniger met hun energie om kunnen gaan waardoor ze uiteindelijk minder last hebben van vermoeidheid. Om de belangrijke volgende stap naar de haalbaarheid van een spieractivator voor toekomstig gebruik in nemaline myopathie te testen, zijn we genooddaakt om het op effect intacte spieren en *in vivo* functie te bepalen. Daarom hebben we muismodellen gemaakt voor vijf verschillende vormen van nemaline myopathie. We hebben gekozen voor deze vijf modellen, omdat deze qua genetica vijf vormen van nemaline myopathie representeren die vaak voorkomen. Daarnaast zijn deze modellen interessant, omdat het verschillende vormen van ernst van spierzwakte betreft. Zo zijn sommige modellen mild qua spierzwakte, en andere zeer zwaar aangedaan. Door het verschil in spierzwakte zullen de tijdstippen waarop de dieren gemeten zullen worden dus ook verschillen. Onderstaande tabel geeft precies aan op welke leeftijd de verschillende modellen gemeten

worden; een tijdstip waarop het dier duidelijk spierzwakte vertoont ten opzichte van controle dieren.

Genotype	Leeftijd
<i>Acta1</i> (H40Y)	~3 maanden
Tg(<i>Acta1</i>)Asp286Gly	~4 maanden
<i>Neb</i> -cKO	~4 maanden
██████████	~6 maanden
██████████ (Dutch founder mutation)	~6 maanden

Op alle muizen zullen we drie belangrijke bepalingen doen om inzicht te krijgen in het effect van een spieractivator:

We bestuderen het effect van een spieractivator op (1) *in vitro* intacte spierfunctie, (2) *in vivo* uithoudingsvermogen en (3) *in vivo* ademhalingsfunctie.

De studie is opgedeeld in twee delen: eerst testen we het effect van *acute* toediening van een spieractivator op de bovengenoemde uitkomstmaten. Als deze studies significante verbetering van spierfunctie en uithoudingsvermogen laten zien, starten we de *chronische* studies waarbij een spieractivator wordt toegevoegd aan het voer.

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

Pathofysiologie

Om het inzicht in twee veelvoorkomende vormen van nemaline myopathie te vergroten, hebben we in twee verschillende muismodellen het betrokken eiwit gelabeld met een fluorescente probe. De lokalisatie en rol van deze eiwitten kunnen we bestuderen middels super-resolutie microscopie.

Testen medicijn

Nemaline myopathie komt voor in verschillende gradaties, mede omdat mutaties in verschillende genen kunnen leiden tot de spierziekte. We hebben de beschikking over vijf muismodellen voor nemaline myopathie, die verschillende mutaties dragen en voor zowel milde als ernstige varianten van de ziekte staan. Op deze dieren worden in totaal drie verschillende proeven gedaan (met cross-over design) om het effect van een spieractivator op intacte spierfunctie te onderzoeken.

In vivo: uithoudingsvermogen

Om te onderzoeken of toediening van een spieractivator de algemene prestatie van de muis verbetert zullen we de dieren op een loopband plaatsen en hun uithoudingsvermogen testen. Met een cross-over design zullen we het effect van een spieractivator op looptijd bestuderen.

In vivo: ademhalingsfunctie

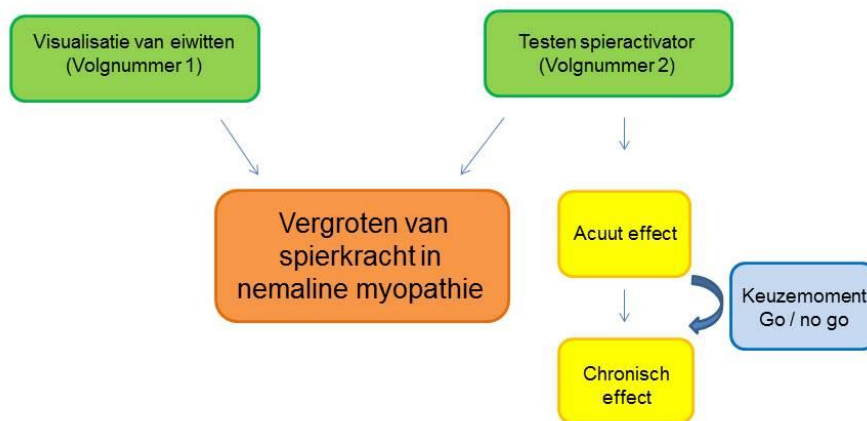
Met name de ademhalingsspier (het diafragma) is vaak het meest aangedaan in nemaline myopathie, en falen van deze spier is in veel gevallen de doodsoorzaak. Om te onderzoeken of het *in vitro* effect op geïsoleerde diafragmaspiercellen te extrapoleren is naar verbetering van *in vivo* condities, meten we ademhalingsfunctie *in vivo* met behulp van plethysmografie.

In vitro: intacte spierfunctie

Het diafragma en perifere spieren worden gedissecteed voor intacte mechanica experimenten. Voor alle spieren zullen we tweemaal een standaard protocol voor spierfunctie draaien voor het bepalen van de (sub)maximale kracht, de vermoeibaarheid van de spier en de calciumhuishouding: eenmaal in aanwezigheid van een spieractivator, eenmaal met alleen placebo (met middel waarin een spieractivator is opgelost).

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.

Ons hoofddoel 'Vergroten van spierkracht in nemaline myopathie' willen we bereiken door een tweeledige aanpak. De eerste strategie zal het ophelderen van de locatie en functie van 2 belangrijke eiwitten zijn in nemaline myopathie. Deze informatie kan in de toekomst leiden tot het testen van een specifiek medicijn dat aangrijpt op de nog te ontrafelen functie van de eiwitten. De tweede strategie betreft het testen van een nieuw medicijn dat beoogt algemene spierfunctie te versterken. Beide strategieën zullen inzicht geven in potentiële mechanismen om spierkracht te verhogen in nemaline myopathie. Het flowdiagram geeft de samenhang van de verschillende onderdelen aan. Per onderzoekslijn wordt daarna de fasering beschreven (mits aanwezig).



Pathofysiologie

De nog onbekende rol van twee belangrijke eiwitten die betrokken zijn bij skeletspierzwakte zal worden opgehelderd door ze fluorescent te labelen en functie in kaart te brengen (volgnummer 1).

Testen medicijn

Om spierzwakte in skeletspieren tegen te gaan zal het effect van een spieractivator getest worden op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen.

Fase 1: acuut effect

Eerst zal het effect van *acuut* toedienen van een spieractivator worden getest op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen (volgnummer 2).

Fase 2: chronisch effect

Als dit tot significante verbetering van spierfunctie leidt, wordt ook het *chronische* effect van een spieractivator getest op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen (volgnummer 2).

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Visualisatie van skeletspiereiwitten

2	<i>In vitro</i> en <i>in vivo</i> skeletspierfunctie
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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- | | |
|------------------------------|---|
| 1.1 Titel van het project | Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen? |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar (deze duur is realistisch gezien de fokschema's van de dieren, de oude leeftijd waarop sommige diermodellen worden bestudeerd, en de tijdrovende fysiologische experimenten) |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Skeletspierfunctie, aangeboren spierziekte, nemaline myopathie, medicijn |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project. | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek |
| | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid |
| | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort |
| | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding |
| | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> 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>Goed werkende spieren zijn noodzakelijk voor het dagelijkse leven: zwakte van skeletspieren (zoals die van het middenrif, de belangrijkste ademhalingspier) kan leiden tot verslechtering van de kwaliteit van leven en tot een vroegtijdige dood. materiaal, waardoor er zieke spieren worden aangemaakt. Een voorbeeld Verminderde spierfunctie kan zowel aangeboren als verworven zijn. Wanneer een spierziekte aangeboren is, zitten er vanaf de geboorte al fouten in het erfelijk hiervan is de erfelijke skeletspierziekte nemaline myopathie: patiënten met nemaline myopathie hebben spierzwakte omdat de spieren niet goed kunnen samentrekken.</p> <p>Om de kwaliteit van leven van patiënten met nemaline myopathie te</p> |
|---|---|

verbeteren stellen wij het volgende onderzoek voor, onderzoek welke uit twee onderdelen bestaat: (1) het bestuderen van de oorzaken van afgenomen spierfunctie en (2) het testen van een veelbelovend medicijn om spierfunctie te herstellen.

We maken gebruik van zowel patiëntmateriaal om de oorzaken van afgenomen spierfunctie te begrijpen, maar ook van proefdieren. De proefdieren bieden ons de mogelijkheid om zowel tot in het kleinste detail als op het niveau van algemene lichaamsfunctie de oorzaken van afgenomen spierfunctie te bestuderen en het effect van nieuwe medicijnen te testen. Zo kunnen we zowel het effect van een erfelijke fout onderzoeken op de kleine eiwitten die onze spier doen samentrekken, maar kunnen we ook bestuderen hoe dit het uithoudingsvermogen van een organisme beïnvloedt. Daarnaast kunnen we bestuderen wat de effecten zijn van een nieuw medicijn - dat aangrijpt op skeletspieren - op het lichaam als geheel. Met de verworven inzichten hopen we een stap dichterbij therapieën te komen.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Ons doel is nieuwe aangrijpingspunten te vinden om spierfunctie te verbeteren. De oorzaak van spierzwakte in patiënten met nemaline myopathie (incidentie 1:50.000) is nog steeds onduidelijk. Studies van onze groep en ook die van andere internationale onderzoeksgroepen hebben recent aangetoond dat veranderingen in de kleinste contractiele eenheden in de spier waarschijnlijk een belangrijke bijdrage leveren. Het doel van onze studies is deze veranderingen beter te begrijpen. Tevens willen we, in samenwerking met een farmaceutisch bedrijf uit de VS, testen of een nieuw medicijn, dat specifiek de functie van die kleinste contractiele eenheden verbetert, spierzwakte vermindert. Met de verworven inzichten hopen we een stap dichterbij therapieën te komen. Helaas kunnen deze inzichten niet meteen in patiënten vergaard worden, maar moeten deze in eerste instantie in proefdieren worden vergaard.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Muizen
Volgnummer 1: 400
Volgnummer 2: 320

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Dieren kunnen negatieve gevolgen ervaren bij het injecteren van vloeistoffen en het blootstellen aan anesthetica. Daarnaast kan ook de spierzwakte die de proefdieren ontwikkelen door veranderingen in hun genen leiden tot ongerief.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Maximaal matig ongerief

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Na afloop van het onderzoek worden de dieren op humane wijze gedood en wordt er zo veel als mogelijk weefsel opgeslagen voor analyses: hart- en skeletspieren, bloedvaten en vet.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig

Het onderzoeken van de onderliggende processen bij spierziekten is complex: interacties tussen diverse systemen in het lichaam spelen een rol. Deze interacties maken het noodzakelijk om deze processen in het intacte

is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

dier te onderzoeken.

4.2 **Vermindering**

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

Benadrukt dient te worden dat er wordt gestreefd naar een optimaal 'gebruik' van het proefdier middels het uitvoeren van verschillende analyses in één dier. Ook proberen we de studies zo slim mogelijk op te zetten, dat zo min mogelijk dieren nodig zijn om antwoord te vinden op de gestelde vragen. Een voorbeeld hiervan zijn de experimenten om een nieuw medicijn te testen. Omdat we gebruik maken van een cross-over opzet, dienen de dieren als hun eigen controle en halveren we hiermee het aantal benodigde proefdieren. Daarnaast investeren we in de aanschaf van goede apparatuur met een hoge meetnauwkeurigheid, zodat een zo laag mogelijk aantal dieren nodig is om verschillen tussen condities op te pikken. Ook hebben we extra apparatuur aangeschaft, zodat we meerdere spieren kunnen meten van hetzelfde dier - daar waar we hier voorheen, met de aanwezigheid van slechts 1 setup, meerdere dieren voor nodig hadden.

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.

We hebben gekozen voor de muis. Deze keuze is gemaakt omdat er diverse type muizen beschikbaar zijn die zich lenen om complexe fysiologische processen die ten grondslag liggen aan de verminderde spierfunctie te bestuderen.

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

Tijdens deze studie wordt er alles aan gedaan om het mogelijke ongerief voor de muizen te voorkomen: bij het transport van het proefdiercentrum naar het laboratorium wordt zo zorgvuldig mogelijk gehandeld om stress levels zo laag mogelijk te houden; de muizen zullen gedurende de experimenten nauwlettend in de gaten gehouden worden. Doding vindt plaats op humane wijze en onder volledige anesthesie, hetgeen het ongerief licht maakt. Pas wanneer de teenreflex volledig afwezig is, zal doding plaatsvinden.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VUMC	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Visualisatie van skeletspiereiwitten

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.

Nemaline myopathie (NM) is een van de meest voorkomende aangeboren spierziekten. Vandaag de dag zijn er 10 genen bekend die betrokken zijn bij het ontstaan van NM. Er is echter nog geen medicijn voor handen. Dit komt met name omdat het ziekteproces nog niet duidelijk in kaart is gebracht. Van twee belangrijke eiwitten die betrokken zijn bij de ziekte, weten we niet (1) waar deze zich bevinden in de spier en (2) wat hun rol is in spierfunctie.

Daarom hebben we twee muismodellen gemaakt (de modellen zijn beschikbaar), waarbij we een fluorescente probe aan deze twee eiwitten hebben toegevoegd. Op deze manier kunnen we met behulp van super-resolutie microscopie de lokalisatie van de eiwitten precies in beeld brengen en inzicht krijgen in hun functie. Met het verworven inzicht hopen we spierzwakte beter te begrijpen, zodat we een gerichte therapie kunnen testen.

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

De dieren zullen onder anesthesie getermineerd worden, waarna vervolgens spieren zullen worden gedissecteed. Met behulp van super-resolutie microscopie zal de lokalisatie en functie van de eiwitten in beeld worden gebracht.

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

Per muismodel wordt de lokalisatie en functie van het eiwit op vier leeftijden vastgesteld: (1) neonataal, (2) 1 maand, (3) 3 maanden en (4) 1 jaar. Er zijn namelijk aanwijzingen dat de expressie en functie verandert met de tijd.

Het aantal benodigde dieren is lastig te schatten. De fluorescente probe die in het eiwit is ingebouwd is zelf een

eiwit (koraaleiwit) en blootstelling aan daglicht vermindert de foton-opbrengst van de probe. Dit betekent dat we spierweefsel niet lang kunnen opslaan in de vriezer, maar zo vers als mogelijk moeten gebruiken.

B. De dieren

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

Per muismodel worden vier leeftijdsgroepen getest: (1) neonataal, (2) 1 maand, (3) 3 maanden en (4) 1 jaar.

Binnen ons vakgebied is een groepsgrootte van minimaal 10 dieren per parameter gebruikelijk om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over de exacte lokalisatie van een fluorescent eiwit. Aangezien we vers weefsel nodig hebben en we voor een 2-tal experimenten dezelfde spieren moeten gebruiken is het de verwachting dat we 20 knock-in en 20 wt muizen nodig hebben. We houden rekening met 25% uitval, (zeer lastige methodologie van isoleren materiaal en innovatieve microscopie), dus dat maakt een totaal van 25 knock-in en 25 wt muizen.

Een leeftijdsgroep bestaat in totaal uit 100 muizen. Dit komt dus op een totaal van $4 * 50 = 200$ muizen per model. Omdat we in totaal 2 modellen gaan meten, komt het neer op en $2 * 200 = 400$ muizen in totaal.

Geslacht: We maken gebruik van zowel vrouwtjes als mannetjes.

Herkomst: de twee muismodellen hebben we laten maken in een core-facility in de VS (University of Arizona). Zodra we goedkeuring verkrijgen, kunnen we de muizen naar Nederland overbrengen.

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

Het onderzoeken van de lokalisatie en functie van grote en onbekende eiwitten (grote eiwit 1 = 800kD, de lokalisatie en functie van eiwit 2 is volledig onbekend) is een complex proces waarin de interacties tussen diverse fysiologische systemen in het lichaam een rol spelen. Deze interacties maken het noodzakelijk om de fysiologie in een intacte spier van een organisme te onderzoeken. Spieren in vissen of fruitvliegen (organismen die makkelijk genetisch gemodificeerd kunnen worden) hebben een andere structuur dan die in mensen en de eiwitten die de structuur bepalen hebben dikwijls een andere compositie. Om deze reden prefereren wij het gebruik van een zoogdier. Voor zover wij weten zijn muizen het enige zoogdier dat tot op heden relatief makkelijk genetisch te modificeren is. Om deze reden hebben we ervoor gekozen deze fluorescente probes in muizen in te bouwen. Het nadeel van een celcultuur is dat de spiereiwitten dikwijls in een embryonale/neonatale isovorm blijven steken en dat maak vergelijking met volwassen spieren onmogelijk. In muizen kunnen wel volwassen isovormen onderzocht worden.

Vermindering

We zullen per leeftijdsgroep de resultaten evalueren. Het geschatte aantal proefdieren is een maximum. Als blijkt dat we met minder al de benodigde informatie hebben verzameld, zullen we minder dieren opnemen in het experiment. We werken met zeer innovatieve microscopie zodat we met de hoogste resolutie de lokalisatie van de eiwitten kunnen bepalen. Deze hoge resolutie draagt bij aan de vermindering van het aantal te gebruiken proefdieren.

Verfijning

Tijdens deze studie wordt er alles aan gedaan om het mogelijke ongerief voor de muizen te voorkomen. De muizen zullen gedurende de huisvesting nauwlettend in de gaten gehouden worden. Terminatie vindt plaats onder volledige anesthesie, hetgeen het ongerief licht maakt.

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.

Tijdens deze studie wordt er alles aan gedaan om het mogelijke ongerief voor de muizen te voorkomen. Dieren worden gemonitord tijdens huisvesting en het termineren vindt plaats onder anesthesie.

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.

De beschreven proeven zijn nog nooit uitgevoerd. In de literatuur zijn de muismodellen ook niet beschreven.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Omdat er geen experimentele procedures van toepassing zijn op de muizen, verwachten we geen aantasting van het welzijn. Het aanbrengen van de lichtgevende probe in het DNA van de dieren is in het verleden al eerder gedaan, dit resulteerde niet in aantasting van het welzijn. De muizen hebben geen spierzwakte.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Nee, omdat er geen experimentele handelingen worden uitgevoerd valt het niet te voorzien dat er zich omstandigheden voordoen om lijden van de dieren te voorkomen.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Soort ongerief	Kwalificatie	Percentage dieren
Vervoer naar afdeling	Licht	100%
Inductie anesthetica	Licht	100%
Termineren	Terminaal	100%

Het cumulatieve ongerief zal neerkomen op 'licht'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het uitnemen van verse intacte spieren is inherent aan het experiment. Daarom kan hier dier daarna niet meer verder leven.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VUMC	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	<i>In vitro</i> en <i>in vivo</i> skeletspierfunctie

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.

Nemaline myopathie (NM) is de meest voorkomende aangeboren spierziekte binnen de groep van aandoeningen waarin verstoringen in het *samentrekken* van de spier leiden tot spierzwakte. Vandaag de dag zijn er 10 genen bekend die betrokken zijn bij het ontstaan van NM. Er is echter nog geen medicijn voor handen. Onlangs hebben we op *geïsoleerde enkele spiercellen* van NM patiënten een veelbelovende spieractivator getest die de spierkracht aanzienlijk verbeterd. Om de stap naar testen van deze stof in patiënten te maken is meer preklinisch werk noodzakelijk. We weten namelijk nog niet wat het effect van de spieractivator is op *intacte spieren* in NM.

Van voorgaande studies weten we dat een spieractivator spieren gevoeliger maakt voor calcium: bij een lager calciumconcentratie levert de spier al meer kracht. De verwachting is dat spieren bij aanwezigheid van een spieractivator minder calcium nodig hebben om dezelfde spierkracht te leveren. Omdat het rondpompen van calcium een grote aanspraak doet op onze energievoorraden, verwachten we dat bij gebruik van een spieractivator de muizen zuiniger met hun energie om kunnen gaan en uiteindelijk minder last hebben van vermoeidheid. Om de belangrijke volgende stap naar de haalbaarheid van een spieractivator voor toekomstig gebruik in NM te testen, zijn we genooddaakt om het effect op intacte spieren en *in vivo* functie te bepalen.

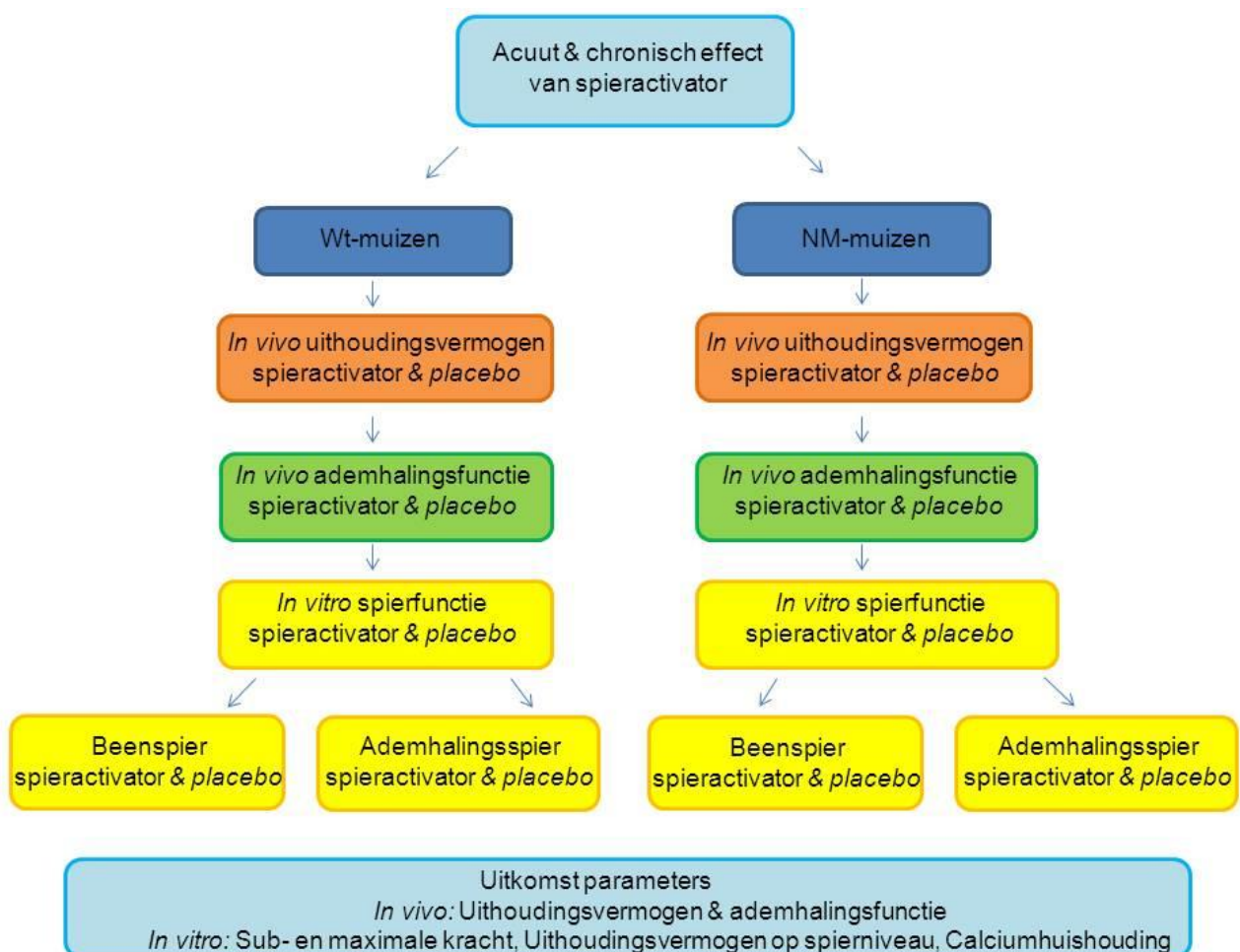
Daarom hebben we muismodellen gemaakt voor vijf verschillende vormen van NM: tezamen representeren zij ruim driekwart van de gevallen binnen de spierziekte: van milde tot zeer ernstige zwakte, van zeer kleine tot grote en recent ontdekte eiwitten die betrokken zijn bij de ziekte. Op dezelfde muizen zullen we drie belangrijke bepalingen doen om inzicht te krijgen in het effect van een spieractivator op intacte spierfunctie, uithoudingsvermogen en ademhalingsfunctie.

In vitro intacte spierfunctie geeft inzicht in hoeveel kracht een spier kan leveren bij sub-maximale en maximale stimulatie. Daarnaast verschaft het inzicht in het uithoudingsvermogen van de spier. Dit zou een belangrijk mechanisme zijn in het verminderen van de vermoeidheid van NM patiënten.

In vivo bepalingen zijn van uiterst belang om te onderzoeken hoe het lichaam als geheel reageert op een spieractivator. We bepalen het uithoudingsvermogen van de muizen op een loopband om te bepalen of een spieractivator de algehele lichaamsprestatie verbetert. Daarnaast kijken we naar *in vivo* ademhalingsfunctie. De ademhalingspier is een vaak aangedane spier in NM, en falen van deze spier is de meest voorkomende doodsoorzaak. Daarom is het verbeteren van ademhalingsfunctie van vitaal belang voor NM patiënten. We meten de ademhalingsfunctie met een plethysmograaf, welke als uitkomstparameters het ademminuutvolume, de inhaleercapaciteit en de ademfrequentie geeft.

De studie is opgedeeld in twee delen: eerst testen we het effect van *acute* toediening van een spieractivator op de bovengenoemde uitkomstmaten. Als deze studies significante verbetering van spierfunctie en uithoudingsvermogen laten zien, starten we de *chronische* studies. Vanaf drie weken na de geboorte, als de muizen niet meer van de moeder afhankelijk zijn, wordt de spieractivator aan het voer toegevoegd.

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.



Per NM muismodel worden er twee groepen muizen gemeten: Het NM-model en een Wildtype van gelijke leeftijd en geslacht. Op deze dieren worden in totaal drie verschillende proeven gedaan (met cross-over design) om het effect van een spieractivator op spierfunctie te onderzoeken. Het flow-diagram hierboven geeft het design van de studie schematisch weer. Hieronder zullen we de verschillende proeven toelichten.

Á
In vivo: uithoudingsvermogen

Om te onderzoeken of toediening van een spieractivator de algemene prestatie van de muis verbetert zullen we de dieren op een loopband plaatsen en hun uithoudingsvermogen testen. Als de muis het tempo niet meer bij kan benen wordt het experiment gestopt en de looptijd genoteerd. Wegens een cross-over design zullen we het effect van een spieractivator op looptijd bestuderen.

In vivo: ademhalingsfunctie

Met name de ademhalingspier is vaak het meest aangedaan in NM, en falen van deze spier is in veel gevallen de doodsoorzaak. Om te onderzoeken of het *in vitro* effect op geïsoleerde diaframacellen te extrapoleren is naar verbetering van *in vivo* condities, meten we diafragmafunctie (de belangrijkste ademhalingspier) *in vivo* met plethysmografie. Dit is een non-invasieve manier om de functie van het diafragma en ademhaling te bestuderen.

In vitro: intacte spierfunctie

De muis zal onder anesthesie gestrekt worden. Vervolgens worden het diafragma en perifere spieren gedissecteed voor intacte mechanica experimenten. Voor alle spieren zullen we tweemaal een standaard protocol voor spierfunctie uitvoeren voor het bepalen van de (sub)maximale kracht, de vermoeibaarheid van de spier en de calciumhuishouding: eenmaal in aanwezigheid van een spieractivator, eenmaal met alleen placebo (met middel waarin de spieractivator is opgelost).

De overige skeletspieren van beide benen en de hartspieren worden gedissecteed, gewogen en bewaard voor verdere analyses.

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

De benodigde groepsgrootte is geschat aan de hand van een power-analyse. De poweranalyse is uitgevoerd aan de hand van de magnitude van zwakte in diafragma- en beenspieren zoals die eerder is gevonden bij intacte mechanica op Wt en NM muizen: 15%. Met een standaarddeviatie die ongeveer 12% bedraagt in de wildtype groep en ongeveer 12% in de NM groep, met een significantie $\alpha=0.05$ en een power $\pi=0.9$ zullen we dan per groep 13 muizen nodig hebben. We houden rekening met 20% uitval, omdat uit ervaring blijkt dat de methode (*in vitro* intacte mechanica) lastig is en daarom onderhevig is aan relatief grote uitval. Daarom verwachten we een totaal van 16 muizen nodig te hebben. Dit maakt in totaal 32 muizen per leeftijdsgroep (16 NM en 16 Wt).

B. De dieren

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

Per NM muismodel wordt eerst het effect van *acute* toediening van een spieractivator getest op 32 muizen (16 Wt en 16 NM). Dit komt dus op een totaal van $5 * 32 = 160$ muizen. Bij een positieve evaluatie van acute toediening van de spieractivator (*in vivo* en *in vitro* spierfunctie neemt significant toe), wordt het *chronische* effect van de spieractivator getest op dezelfde parameters (dus gelijk aantal dieren per NM muismodel), dus wederom $5 * 32 = 160$ dieren. In totaal gaat het dan om 320 dieren.

Geslacht: We maken gebruik van alleen mannetjes. De reden hiervoor is dat uit de literatuur blijkt dat spierfunctie in vrouwtjes onderhevig is aan hormonale schommelingen en daardoor ongewenste variatie introduceert (Ogawa *et al.*, 2015; Colson *et al.*, 2015). Het gebruik van vrouwtjes zal de spreiding op data vergroten, waardoor er meer dieren nodig zijn om bepaalde effecten aan te tonen.

De mate van spierzwakte die de verschillende muismodellen ontwikkelen verschilt per genotype. We zullen op die leeftijd meten, dat aanzienlijke spierzwakte optreedt. Zie hieronder voor een overzicht van de te meten leeftijd en afkomst.

Genotype	Leeftijd	Oorsprong
<i>Acta1</i> (H40Y)	~3 maanden	The University of Western Australia
Tg(<i>Acta1</i>)Asp286Gly	~4 maanden	The University of Western Australia
<i>Neb</i> -cKO	~4 maanden	University of Arizona
██████████	~6 maanden	UPC Amsterdam
██████████ (Dutch founder mutation)	~6 maanden	University of Arizona

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

Het onderzoeken van de effecten van een spieractivator, een nieuwe veelbelovende stof om spierkracht te vergoten, is een complex proces waarin de interacties tussen diverse systemen in het lichaam een rol spelen. Deze interacties maken het noodzakelijk om de (patho)fysiologie in het intacte dier te onderzoeken.

Vermindering

Benadrukt dient te worden dat er wordt gestreefd naar een optimaal 'gebruik' van het proefdier middels het uitvoeren van verschillende analyses in één dier: zowel het effect van de spieractivator op *in vivo* uithoudingsvermogen, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vitro* skeletspierfunctie worden in één dier getest. Met de aanschaf van een extra setup voor het meten van intacte spieren kunnen we nu voor het eerst meerdere spieren meten van hetzelfde dier, daar waar we er tot nu toe – met de aanwezigheid van slechts één setup – drie dieren voor nodig hadden. Per dier wordt er op drie typen spieren getest wat het effect van de spieractivator is vergeleken met een placebo conditie. Zo dient het dier als eigen controle en hebben we geen controle groepen nodig (dit halveert het aantal benodigde proefdieren). Nadat de drie hierboven genoemde experimenten zijn uitgevoerd, worden er nog meer bepalingen op de spieren van de dieren gedaan, om zoveel mogelijk te leren van het effect van de spieractivator op spiergrootte, ultrastructuur en expressie van diverse eiwitten. Daarnaast bestuderen we de pathofysiologie van de verschillende soorten NM: mitochondriële functiebepalingen, eiwitexpressie, ultrastructuur, microscopie en metingen aan zowel geïsoleerde hart- als skeletspiercellen.

Verfijning

Tijdens deze studie wordt er alles aan gedaan om het mogelijke ongerief voor de muizen te voorkomen. De muizen zullen gedurende de experimenten nauwlettend in de gaten gehouden worden. Terminatie vindt plaats onder volledige anesthesie, hetgeen het ongerief licht maakt.

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.

Tijdens deze studie wordt er alles aan gedaan om het mogelijke ongerief voor de muizen te voorkomen. Naar aanleiding van eerdere studies op de loopband en in de plethysmograaf, verwachten we echter dat de dieren geen last hebben van de experimentele bepalingen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Het nemaline myopathie veld werkt internationaal goed samen. We weten van elkaar welke proeven er worden gedaan. Er zijn geen andere labs die deze experimenten uitvoeren. Daarnaast werken we nauw samen met het bedrijf dat de spieractivator ontwikkelt. Zij hebben overzicht van alle studies met de spieractivator. Tot voor kort werd de stof alleen getest op modellen waarin de spier minder neuronale input heeft, zoals bij ALS, MS of Myasthenia Gravis. Onze NM modellen zijn de eerste modellen met sarcomeerdysfunctie waarin de

spieractivator getest wordt. Deze modellen hebben een intacte neuronale input, dus het is zeer interessant om te onderzoeken hoe deze dieren reageren op de spieractivator.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Omdat er genetisch een spierziekte wordt geïnduceerd, verwachten we dat de spieren zwak kunnen zijn. De looptest en de ademhalingstest geven matig ongerief. De muizen worden op een loopband gedwongen te rennen. Tijdens de ademhalingstest zitten ze gedurende een uur in een kleine kooi. We weten uit de literatuur dat dit hun ademfrequentie verhoogt (welke na een uur normaliseert). Andere vormen van welzijnsaantasting worden niet verwacht (op basis van ervaring uit het verleden, er is al ervaring met de diverse muismodellen).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het aanbrenge van de mutatie in de genen van de muizen induceert spierzwakte.

De verhoogde stress tijdens de testen komt door het gedwongen rennen (looptest) en door de blootstelling aan en nieuwe, kleine kooi (ademhalingstest).

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

De dieren zullen uitgebreid gemonitord worden op symptomen van welzijnsaantasting. Blootstelling aan de stress als gevolg van de looptest en ademhalingstest is helaas niet te voorkomen.

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.

Kenmerk van de spierziekte is dat bewegen bemoeilijkt is door zwakke spieren. De dieren zullen gemonitord worden op beweeglijkheid. Dit gebeurt op basis van visuele inspectie. Daarnaast zullen de dieren om de 3 dagen gewogen worden. Wanneer de muizen meer dan >20% van hun maximaal gewogen lichaamsgewicht verliezen zullen de muizen geëuthaniseerd worden.

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

Nihil <1%

K. Classificatie van ongerief

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

De *in vivo* experimenten, het transport naar [REDACTED] en het termineren onder isofluraan zijn allen handelingen die tot gering of hooguit licht ongerief zullen zorgen.

Hieronder een overzicht van het ongerief per handeling. Het cumulatieve ongerief zal neerkomen op 'matig'.

Soort ongerief	Kwalificatie	Percentage dieren
Looptest	Matig	100%
IP injectie (2x)	Licht	100%
Ademhalingstest	Matig	100%
IP injectie (2x)	Licht	100%
Vervoer naar afdeling	Licht	100%
Inductie anesthetica	Licht	100%

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Bij het terminale experiment worden intacte spieren uitgenomen voor *in vitro* studies. Het is ethisch en fysiologisch niet mogelijk zonder beenspieren en ademhalingsspier verder te leven.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

2. Titel van het project:

Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?

3. Titel van de NTS:

Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning*
- wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
- telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
- mailadres contactpersoon: [REDACTED]

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

- ontvangen door DEC: 17-12-2015*
- aanvraag compleet: 17-12-2015*
- in vergadering besproken: 12-1-2016*
- anderszins behandeld: *n.v.t.*
- termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
- aanpassing aanvraag: n.v.t.*
- advies aan CCD: 31-03-2016*

7. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: *18-1-2016 en 3-2-2016*

- Strekking van de vraag / vragen:

De DEC is van mening dat de strategie en het doel beter moeten worden toegelicht. Er moet meer achtergrondinformatie komen over de twee eiwitten die onderzocht worden, waarom kiest men voor deze twee en welke kennis heeft men over deze eiwitten? De samenhang tussen beide subdoelen moet worden toegelicht. De fasering en keuzemomenten moeten duidelijker naar voren komen. Bovendien moet er nog even een spellingscheck worden uitgevoerd.

- Datum antwoord: 1-2-2016 en 10-2-2016

- Strekking van het (de) antwoord(en):

De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de toelichting is gegeven.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t. (geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project)*

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- ✓ *uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord*
- *uit onderwijskundig oogpunt verantwoord*
- *uit het oogpunt van productiedoelinden verantwoord*
- *wettelijk vereist*

2. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en toegepast onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.*

Het hoofddoel van deze studie is om meer inzicht verkrijgen over de onderliggende mechanismen van spierzwakte bij patiënten met aangeboren nemaline myopathie en om nieuwe behandelingsmethoden te onderzoeken. Dit zal worden onderzocht door een beter inzicht te verwerven in de pathofysiologie van spierzwakte en het testen van een spieractivator. Het uiteindelijke doel is om de kwaliteit van leven van patiënten met nemaline myopathie te verbeteren. De bevindingen zullen niet alleen van toepassing zijn op patiënten met nemaline myopathie, maar ook bij mensen met afgenomen spierfunctie door andere oorzaken, bijvoorbeeld een verminderde spieractivatie bij veroudering en diverse andere spierziektebeelden.

3. *De DEC onderschrijft het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling, te weten:*

Het wetenschappelijk belang: Spierzwakte is een grote belemmering in het dagelijks leven van mensen met een spierziekte, in de revalidatie en bij ouderen. Nemaline myopathie (NM) is een van de meest voorkomende aangeboren spierziekten. Er is echter nog geen medicijn voor handen, dit komt vooral omdat het ziekteproces nog niet duidelijk in kaart is

gebracht. Van twee belangrijke eiwitten die betrokken zijn bij de ziekte willen de onderzoekers de lokalisatie bepalen om zo beter inzicht verkrijgen in de functie van deze eiwitten.

Het maatschappelijk belang: De verkregen kennis over de lokalisatie van de eiwitten kan bijdragen aan het beter begrijpen van de onderliggende biologische processen van de pathologie en dit kan bijdragen aan het opstellen van nieuwe/verbeterde therapieën. De onderzoekers gaan een nieuw mogelijk medicijn, een spieractivator testen. Dankzij dit geplande experiment komt men veel te weten over de effectiviteit van een spieractivator, zodat een gerichte therapie kan worden ontwikkeld. De bevindingen kunnen hopelijk de kwaliteit van leven van nemaline myopathie patiënten verbeteren. De resultaten van dit onderzoek zullen niet alleen van toepassing zijn op patiënten met nemaline myopathie, maar ook mensen met afgenomen spierfunctie door andere oorzaken. Het maatschappelijk belang van dit onderzoek is daarom, naar de mening van de DEC, substantieel.

Door dit onderzoek ontstaat er meer kennis over de pathofysiologie van spierzwakte en over de effectiviteit van een spieractivator. Het wetenschappelijke belang wordt door de DEC ingeschat als reëel, het maatschappelijk belang als substantieel.

- 4. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.*

Binnen de onderzoeksgroep is zowel voldoende deskundigheid als financiering aanwezig om het project succesvol uit te voeren. De onderzoekers hebben ruime ervaring met de voorgestelde experimenten en alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, dit waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met andere (internationale) onderzoeksinstituten in het veld van nemaline myopathie, om ervoor te zorgen dat de proeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Ook hebben de onderzoekers nauw contact met het bedrijf dat de spieractivator ontwikkelt. Dit bedrijf heeft een overzicht van alle studies met de spieractivator, welke eerder is getest met modellen waarin de spier een verminderde neuronale input ontvangt, zoals bij ALS, MS of Myasthenia Gravis. De gebruikte NM modellen in deze studie zijn de eerste modellen met sarcomeerdysfunctie waarin de spieractivator getest wordt. Eerder gevonden resultaten maken het aannemelijk dat de voorgestelde therapie op een gunstig effect zal wijzen.

De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen experimenten beschreven in het project nieuwe en/of aanvullende inzichten over nemaline myopathie en over de effectiviteit van een spieractivator als mogelijke therapie in nemaline myopathie zullen worden verkregen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de fokschema's van de dieren, de leeftijd waarop sommige diermodellen worden bestudeerd en de langdurende fysiologische experimenten.

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw. De onderzoekers betogen dat het hoofddoel zal worden bereikt door een tweeledige aanpak: 1) het ophelderen van de locatie en functie van twee belangrijke eiwitten in nemaline myopathie; de voorgestelde experimenten zullen naar het inzicht van de DEC resulteren in het behalen van dit subdoel,

en 2) het testen van een specifiek medicijn dat beoogt de algemene spierfunctie te versterken en dat aangrijpt op de nog te ontrafelen functie van de eiwitten; de voorgestelde experimenten zullen naar het inzicht van de DEC resulteren in het behalen van dit subdoel. Beide strategieën zullen inzicht geven in potentiële mechanismen om spierkracht te verhogen in nemaline myopathie. Er is sprake van een duidelijk geformuleerd hoofddoel; de DEC heeft geconstateerd dat de twee subdoelen weliswaar beide bijdragen aan het inzicht in het verloop van de ziekte, maar dat er geen duidelijke afhankelijkheid is tussen de beide subdoelen.

5. Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Het verwachte ongerief is licht tot matig. Licht ongerief wordt verwacht als gevolg van het vervoer, de inductie van anesthetica en de IP injecties. De dieren zullen een hoger stresslevel hebben tijdens de looptest (door het gedwongen rennen) en tijdens de ademhalingstest (door de blootstelling aan een nieuwe kleine kooi gedurende een uur, waardoor hun ademfrequentie tijdelijk wordt verhoogd) dit zorgt voor matig ongerief. Blootstelling aan de stress als gevolg van de testen is niet te voorkomen. Ernstig ongerief wordt niet verwacht.

Omdat er genetisch (mutatie van genen) een spierziekte wordt geïnduceerd, kunnen de spieren van de dieren zwak zijn. De dieren zullen gemonitord worden op symptomen van welzijnsaantasting zoals beweeglijkheid en gewicht, om zo het ongerief te minimaliseren. Wanneer de dieren meer dan 20% van hun maximaal gewogen lichaamsgewicht verliezen of er meer dan matig ongerief optreedt dan wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd.

7. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de **vervanging** van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Voor het onderzoeken van de lokalisatie en functie van de eiwitten en het onderzoeken van de effecten van een spieractivator is het gebruik van diermodellen onvermijdelijk. Beide zijn complexe processen waarin de interacties tussen diverse fysiologische systemen in het lichaam een rol spelen, deze interacties maken het noodzakelijk om de fysiologie in een intacte spier van een organisme te onderzoeken.

Spieren in vissen of fruitvliegen (organismen die makkelijk genetisch gemodificeerd kunnen worden) hebben een andere structuur en eiwitcompositie dan die in mensen, om deze reden gebruikt men hier zoogdieren. De onderzoekers hebben hier gekozen voor muizen omdat deze dieren makkelijk genetisch te modificeren zijn en de benodigde transgene modellen al zijn gegenereerd. Onderzoek naar spieren in een celcultuur heeft als nadeel dat

de spiereiwitten in een embryonale/neonatale isovorm kunnen blijven, wat de vergelijking met volwassen spieren onmogelijk maakt. In muizen kunnen wel volwassen isovormen onderzocht worden, daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.

Tijdens het onderzoek zal men bij dierproeftype 1 zowel vrouwtjes als mannetjes gebruiken. Bij dierproeftype 2 gebruikt men alleen mannelijke dieren. De reden hiervoor is dat de spierfunctie/spierzwakte van vrouwelijke dieren onderhevig is aan hormonale schommelingen, waardoor ongewenste variatie in de data ontstaat. Door alleen mannetjes te gebruiken vermindert men het gebruik van extra dieren die nodig zijn om deze variatie te verkleinen.

8. *In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven.*

Door het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 720 muizen, en acht dit aantal realistisch onderbouwd.

Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten. De onderzoeksgroep werkt met zeer innovatieve microscopie, zodat ze met hoge resolutie de lokalisatie van de eiwitten kunnen bepalen, waardoor het aantal te gebruiken proefdieren minimaal is. Bovendien vinden er meerdere analyses plaats in één dier en kan men dankzij nieuwe apparatuur meerdere spiertypen meten in hetzelfde dier, zodat er optimaal gebruik wordt gemaakt van het aantal dieren. Tevens zijn de experimenten zo opgezet dat de dieren als eigen controle kunnen dienen, waardoor geen extra controle groepen nodig zijn.

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.*

Om het ongerief te minimaliseren worden alle handelingen door ervaren/bekwame onderzoekers en diervverzorgers uitgevoerd. De dieren worden nauwlettend in de gaten gehouden om ongerief te voorkomen en/of te minimaliseren. Mochten er onvoorziene complicaties optreden die meer dan matig ongerief veroorzaken dan wordt op basis van de geformuleerde humane eindpunten het experiment onmiddellijk beëindigd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. *De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

D. Ethische afweging

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van is om meer inzicht vergaren over de onderliggende mechanismen van spierzwakte bij patiënten met nemaline myopathie en om nieuwe behandelingsmethoden te onderzoeken.

Het verwachte resultaat, het verbeteren van de kwaliteit van leven van patiënten met spierzwakte (o.a. bij nemaline myopathie), is afgewogen tegen het, maximaal als matig ingeschatte ongerief, aantasting van integriteit en het doden van de dieren in de proef. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 720 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.

Het wetenschappelijke belang wordt door de DEC ingeschat als reëel en het maatschappelijke belang als substantieel. De resultaten zullen bijdragen aan het verkrijgen van meer inzicht in spierzwakte en het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor patiënten met nemaline myopathie. Op termijn kunnen de uitkomsten van het project leiden tot betere/effectievere behandelingsmethoden voor de patiënten met spierzwakte.

De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat de projectdoelstelling binnen de gevraagde termijn wordt behaald. Er is sprake van een hoofddoelstelling (inzicht verwerven in de pathofysiologie van spierzwakte en het testen van een nieuwe medicijn) maar de DEC heeft geconstateerd dat er er feitelijk sprake is van twee tamelijk eigenstandige subdoelen; de nieuwe kennis over de lokalisatie van de eiwitten is geen noodzakelijke voorwaarden tot het uitvoeren van de experimenten met het nieuwe medicijn. Wij achten echter een onverdeeld advies over dit onderzoek toch mogelijk, omdat de waarden en belangen van de deelprojecten onderling niet afwijken en omdat de wetenschappelijke aard van het onderzoek zeer verwant is in beide deelprojecten. Er is er voldoende nauw verband tussen de deelprojecten in ethisch opzicht vaststelbaar. Beide subdoelen zijn elk apart voldoende belangrijk en wegen genoeg op tegen de mate waarin de dieren worden geschaad. Vandaar dat wij toch unaniem op dit punt het voorgestelde project als geheel toetsbaar hebben geacht.

De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is van reëel wetenschappelijk en substantieel maatschappelijk belang en van goede kwaliteit. Samenvattend kan worden gesteld dat het belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 720 muizen en het daarbij verwachte maximale matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ✓ *De DEC adviseert de vergunning te verlenen*

2. *Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus*

3. Dilemma bij deze aanvraag

Binnen de DEC is discussie geweest over de toetsbare eenheid van de aanvraag. Volgens sommigen is er sprake van een duidelijke eenheid omdat het weliswaar gaat om twee verschillende benaderingen maar met uiteindelijk dezelfde hoofddoelstelling. Anderen binnen de commissie vinden logische samenhang tussen beide subdoelen onvoldoende duidelijk en vinden dat er eerder sprake is van twee eigenstandige projecten; een fundamenteel wetenschappelijk project (de lokalisatie van de eiwitten betrokken bij NM) en daarnaast een translationeel project (het testen van een nieuw medicijn), min of meer toevallig in het kader van het onderzoek naar dezelfde aandoening.

Ondanks dit knelpunt is de DEC van mening dat de ethische afweging niet wezenlijk wordt gecompliceerd, terwijl de CCD hier om een eigenstandige beoordeling lijkt te vragen zoals aangegeven in haar (concept)-handreikingen. Wij achten een onverdeeld advies over dit project desondanks goed mogelijk, omdat de waarden en belangen van de deelprojecten onderling niet afwijken en omdat de wetenschappelijke aard van het onderzoek wel zeer verwant is in beide deelprojecten en beide projecten goed onderbouwd zijn in termen van doelstelling, uitvoering en gevolgen voor het ongerief van de betrokken proefdieren. Zelfs als de hoofddoelstelling in logische zin enigszins vaag is, is er wel een voldoende nauw verband tussen de deelprojecten in ethisch opzicht vaststelbaar.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum



**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
AVD114002016501

Bijlagen

2

Datum 1 april 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002016501. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	11400
Naam instelling of organisatie:	Vrije Universiteit Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[REDACTED]
KvK-nummer:	64156338
Straat en huisnummer:	De Boelelaan 1117
Postcode en plaats:	1081 HV AMSTERDAM
IBAN:	NL07DEUT0549310002
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Stichting VU-VUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum



**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
AVD114002016501

Bijlagen

2

Datum 1 april 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 april 2016

Vervaldatum: 1 mei 2016

Factuurnummer: 16700501

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD114002016501	€ 1.187,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 18 mei 2016 11:35
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvulling AVD114002016501

Beste meneer [REDACTED]
 De CCD is voornemens uw project te vergunnen, echter verzoeken wij u de NTS aan te passen. De eerste alinea, bij 3.1, bevat zinnen die niet goed op elkaar aansluiten. Zodra wij een nieuwe NTS hebben ontvangen waar dit is aangepast, ontvangt u de vergunning voor uw project.
 U mag uw project nog niet starten voordat u de vergunning hebt ontvangen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 11 mei 2016 9:49
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvulling AVD114002016501

Beste [REDACTED]
 Dank voor uw snelle respons. De antwoorden op uw aanvullende vragen zijn bijgesloten.
 Met vriendelijke groeten

[REDACTED]

[REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
 Amsterdam
 Netherlands

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: maandag 9 mei 2016 15:46
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvulling AVD114002016501

Geachte [REDACTED]
 Dank voor uw antwoord. Wij hebben aanvullend hierover nog enkele vragen.

Uit uw aanvraag maken wij op dat in Bijlage 2 een spieractivator getest zal worden die al geselecteerd is op basis van eerder experimenten, waarvoor geen informatie nodig is uit Bijlage 1. In onderstaand antwoord geeft u aan dat Bijlage 2 pas kan plaatsvinden als de locatie en functie van de bij spierzwakte betrokken eiwitten aangetoond is.

U geeft aan dat u de functie van enkel deze eiwitten middels therapeutische interventie zult versterken in Bijlage 2. Kunt u dit verder toelichten?

Kunt u daarnaast aangeven wat de relatie is tussen de spieractivator van Bijlage 2 en de bovengenoemde eiwitten uit Bijlage 1, waarvan u de functie wilt versterken?

U heeft in uw aanvraag geen go-no go momenten benoemd. Kunt u de go-no go momenten binnen uw project benoemen? U wordt verzocht in ieder geval aandacht te besteden aan de go-no go momenten tussen Bijlage 1 en Bijlage 2. Kunt u daarbij aangeven op basis van welke criteria de keuzes gemaakt worden?

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

Stuur de ontbrekende informatie uiterlijk 12 mei op. Dit kan per e-mail, u hoeft stukken hier niet op aan te passen.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 6 mei 2016 14:04
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: Aanvulling AVD114002016501

Beste [REDACTED]

Dank voor uw snelle respons. Beneden is onze respons op de vragen van de CCD. We hopen dat we hiermee de onduidelijkheden wegnemen (deze respons hebben we tevens verwerkt in het bijgesloten bestand, pagina 5)

Met vriendelijke groeten,

Respons: er is weldegelijk samenhang en afhankelijkheid tussen beide bijlages, daar bijlage 1 zich concentreert op de pathofysiologie van vormen van nemaline myopathie, en bijlage 2 gericht is op het testen van therapieën. Deel 2 kan pas plaatsvinden als de pathofysiologie van bijlage 1 in kaart is gebracht. Zo hebben de experimenten beschreven in bijlage 1 als doel de locatie en functie van eiwitten die betrokken zijn bij spierzwakte in nemaline myopathie op te helderen, zodat we inzicht krijgen in de oorzaak van spierzwakte. Als het fundamentele werk is afgerond en we hebben aangetoond dat verstoringen in de locatie en functie van deze eiwitten spierzwakte veroorzaken in nemaline myopathie, dan kunnen we aanvangen met het versterken van de functie van deze eiwitten middels therapeutische interventie- beschreven in bijlage 2. De studies beschreven in bijlage 2 betreffen dus translationele experimenten waarbij het effect van een potentieel medicijn getest wordt dat beoogt spierkracht te verhogen.

Samenvattend, subdoel 1 'Pathofysiologie-Visualisatie van eiwitten' is van essentieel belang om subdoel 2 'Testen medicijn' tot een succes te maken en het hoofddoel te bereiken.

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 3 mei 2016 14:13
Aan: [REDACTED]

CC: ██████████

Onderwerp: Aanvulling AVD114002016501

Geachte meneer, mevrouw,
Op 31 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?' met aanvraagnummer AVD114002016501. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.

Welke informatie nog nodig

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

Uw aanvraag omvat twee subdoelen; inzicht verwerven in de pathofysiologie van spierzwakte en het testen van een nieuw medicijn. Kunt u de samenhang van deze verschillende doelen toelichten? Is er een afhankelijkheid tussen de dierproeven in resultaten of tijd?

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Indien wij de informatie deze week ontvangen, kan uw aanvraag de eerstvolgende vergadering van de CCD behandeld worden. U kunt uw antwoord aanleveren via e-mail.

Wanneer een beslissing

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

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,

██████████

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl

Uit uw aanvraag maken wij op dat in Bijlage 2 een spieractivator getest zal worden die al geselecteerd is op basis van eerder experimenten, waarvoor geen informatie nodig is uit Bijlage 1. In onderstaand antwoord geeft u aan dat Bijlage 2 pas kan plaatsvinden als de locatie en functie van de bij spierzwakte betrokken eiwitten aangetoond is.

U geeft aan dat u de functie van enkel deze eiwitten middels therapeutische interventie zult versterken in Bijlage 2. Kunt u dit verder toelichten?

Respons: De spieractivator grijpt aan op de contractiele eiwitten van de spier, de eiwitten die de spiercel doen samentrekken, en deze bevinden zich op het dunne filament van de sacomeer. Om precies te zijn, de spieractivator zorgt ervoor dat calcium langer wordt vastgehouden op het troponine-complex en induceert zodoende een conformatieverandering in tropomyosine, waardoor er bij eenzelfde calciumconcentratie meer cross-bridges gevormd kunnen worden (de cross-bridges zorgen voor krachtgeneratie). De spieractivator grijpt dus selectief aan op het troponine-complex en de contractiele eiwitten die met het troponine-complex samenwerken.

Kunt u daarnaast aangeven wat de relatie is tussen de spieractivator van Bijlage 2 en de bovengenoemde eiwitten uit Bijlage 1, waarvan u de functie wilt versterken?

Respons: Om spiercontractie te realiseren, werkt het troponine-complex nauw samen met andere contractiele eiwitten, eiwitten die dikwijls gemuteerd zijn in nemaline myopathie. Nebuline is zo'n eiwit (meer dan 50% van de patienten met nemaline myopathie hebben een mutatie in het gen dat codeert voor nebuline). Er is indirect bewijs dat nebuline interacteert met troponine en dat mutaties in nebuline deze interactie vestoren en daardoor de affiniteit van het troponine complex en tropomyosine voor calcium verlagen. Dit geeft spierzwakte. Wij willen testen of, door toediening van de spieractivator, troponine/tropomyosine calcium langer kunnen vasthouden en zodoende de spier meer kracht kan leveren.

Echter, dan willen we wel eerst testen of nebuline en troponine/tropomyosine direct interacteren. Er is nog maar weinig bekend over nebuline omdat het een enorm groot eiwit is (>800 kD). Deze grootte maakt het lastig om met behulp van conventionele technieken de functie en locatie van het eiwit te achterhalen. Om exact te weten waar het eiwit zit - en of het dus een interessante kandidaat is voor gebruik van de spieractivator - zijn we dus genoodzaakt innovatieve technieken te gebruiken. Daarom hebben we de experimenten in Bijlage 1 ontworpen.

We hebben een muismodel gemaakt met een speciale fluorescerende probe (██████████) waarmee we met behulp van state-of-the-art microscopie (STORM/PALM, een type super-resolutiemicroscopie) de exacte locatie van nebuline ten op zichte van andere eiwitten kunnen bepalen.

Het tweede muismodel dat we beschrijven in Bijlage 1 heeft deze speciale fluorescerende probe ingebouwd in een geheel nieuw eiwit dat betrokken is bij nemaline myopathie: ██████████. Van dit eiwit weten we nog nauwelijks iets over locatie en functie binnen de spier. Recente artikelen laten nu wel zien dat twee andere eiwitten van dezelfde eiwitfamilie als ██████████ interacties aangaan met nebuline en de kwaliteit van het nebuline molecuul reguleren. We willen door middel van de experimenten beschreven in Bijlage 1 de locatie en functie van

■■■■■ achterhalen. Als het inderdaad samenwerkt met de contractiele eiwitten waarop de spieractivator aangrijpt, verwachten wij dat de spieractivator beschreven in Bijlage 2 een zeer interessante kandidaat is om spierfunctie te versterken in deze variant van nemaline myopathie.

U heeft in uw aanvraag geen go-no go momenten benoemd. Kunt u de go-no go momenten binnen uw project benoemen? U wordt verzocht in ieder geval aandacht te besteden aan de go-no go momenten tussen Bijlage 1 en Bijlage 2. Kunt u daarbij aangeven op basis van welke criteria de keuzes gemaakt worden?
Respons: De experimenten beschreven in Bijlage 2 zijn gericht op het versterken van spieren middels een spieractivator die aangrijpt op contractiele eiwitten. Zoals hierboven beschreven is al wel bekend dat de activator aangrijpt op het troponine-complex en tropomyosine, maar we nog niet of nebuline ook interacteert en een conformatieverandering ondergaat met deze eiwitten na toedienen van de spieractivator. Dit willen we te weten komen door een combinatie van superresolutie microscopie om nebuline te lokaliseren en het gebruik van fluorescente antilichamen voor het aankleuren van het troponine-complex. Als uit de kleuringen blijkt dat nebuline interacteert met de eiwitten waarop de spieractivator aangrijpt, zal gestart worden met de experimenten beschreven in bijlage 2.

Hetzelfde criterium geldt ook voor het tweede muismodel dat beschreven is in Bijlage 1. Als blijkt uit de lokalisatiestudies dat het nieuwe eiwit ook interacteert met de contractiele eiwitten waarop de spieractivator aangrijpt (i.e. troponine-complex en tropomyosine), dan zal dat een Go geven voor het starten van de experimenten beschreven in bijlage 2.

Bijlage 2 bevat ook een go-no go moment, welke is aangegeven in het flow-diagram in het projectvoorstel. Pas wanneer experimenten waarbij de spieractivator acuut wordt toegevoegd laten zien dat spierkracht verhoogd wordt, zal gestart worden met de chronische experimenten waarbij we ook de lange termijn effecten van de spieractivator zullen bestuderen.



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- 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
- 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.

Goed werkende spieren zijn noodzakelijk voor het dagelijks leven: problemen in skeletspieren (de

ademhalingsspier is een pregnant voorbeeld) kunnen leiden tot verslechtering van de kwaliteit van leven en een vroegtijdige dood. Verminderde spierfunctie kan zowel erfelijk als verworven zijn. Een voorbeeld van een erfelijke skeletspierziekte is nemaline myopathie. Dit is de meest voorkomende aangeboren spierziekte binnen de groep van aandoeningen waarin verstoringen in het *samentrekken* van de spier leiden tot spierzwakte (incidentie 1:50.000). Bij nemaline myopathie leiden mutaties in genen die coderen voor eiwitten in de sarcomeer – de kleinste contractiele eenheid in een spier – tot spierzwakte. De moleculaire mechanismen waardoor mutaties leiden tot spierzwakte zijn onvoldoende bekend en daarom is een specifieke en gerichte behandeling van patiënten nu niet mogelijk. Naast het vergroten van het inzicht in het verloop van de ziekte, willen we ook een medicijn testen die de sarcomeerfunctie verbetert.

Het project heeft zowel een fundamenteel als een translationeel karakter. Om spierfunctie van patiënten te verbeteren, is het allereerst van belang de mechanismen onderliggend aan spierzwakte in kaart te brengen. Inzicht verwerven in de pathofysiologie van aangeboren spierzwakte is de fundamentele kant van dit project. Het translationele deel betreft het testen van een nieuw en veelbelovend medicijn – een spieractivator- om spierkracht te verhogen.

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?

Algemeen doel: inzicht verwerven in de pathofysiologie van spierzwakte en het testen van een nieuw medicijn.

In dit project willen we meer inzicht vergaren over de onderliggende mechanismen van spierzwakte bij patiënten met nemaline myopathie. Met dit project willen we de volgende onderzoeksvragen beantwoorden;

1. Wat is de pathofysiologie van (1) de meest voorkomende vorm van nemaline myopathie en (2) de meest recent gediagnostiseerde vorm van nemaline myopathie? Waar bevinden de betrokken eiwitten zich en wat is hun rol in het genereren van spierkracht?
Van zowel het meest voorkomende eiwit dat is aangedaan bij nemaline myopathie als het meest recent gediagnostiseerde eiwit is nauwelijks bekend waar de eiwitten zich bevinden in de spiercel en welke rol ze spelen bij de ontwikkeling van spierkracht. Daarom begrijpen we niet hoe genetische fouten die betrekking hebben op deze eiwitten kunnen leiden tot spierzwakte. Het is van essentieel belang om de lokalisatie en de rol van deze eiwitten in kaart te brengen om het ziektemechanisme te begrijpen en aangrijpingspunten voor therapieën te ontwikkelen.
2. Wat is het effect van acute en chronische blootstelling aan een spieractivator op spierfunctie in vijf nemaline myopathie muismodellen ?

Haalbaarheid

Onze afdeling heeft ruime ervaring met de voorgestelde experimenten en de benodigde infrastructuur, getuige meerdere publicaties in internationaal gerenommeerde tijdschriften. Ook zijn er voldoende financiële middelen om personeel aan te stellen en apparatuur aan te schaffen om de geplande experimenten uit te voeren.

3.3 Belang

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

Dit project heeft als doel meer inzicht te krijgen in aangeboren verstoringen in skeletspierfunctie en om nieuwe behandelingsmethoden te onderzoeken.

Spierzwakte is een grote belemmering in het dagelijks leven van mensen met een spierziekte, in de revalidatie en bij ouderen. Bij een groot aantal patiënten met een spierziekte leidt falen van de ademhalingspier (het diafragma) zelfs tot een vroegtijdige dood. Voor patiënten met nemaline myopathie – de meest voorkomende aangeboren spierafwijking met verstoorde contractie-eiwitten – is momenteel geen medicijn beschikbaar. Het is onze verwachting dat het medicijn dat we gaan testen, een spieractivator, de kwaliteit van leven van deze patiënten verbetert. We komen met de geplande experimenten veel te weten over de werking van een spieractivator op intacte spierfunctie in het gehele lichaam. De bevindingen zullen niet alleen van toepassing zijn op patiënten met nemaline myopathie, maar ook mensen met afgenomen spierfunctie door andere oorzaken, bijvoorbeeld een verminderde spieractivatie bij veroudering en diverse andere spierziektebeelden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het algemene doel van deze projectaanvraag is om meer inzicht te verkrijgen in de onderliggende mechanismen van verminderde skeletspierfunctie van patiënten met nemaline myopathie en om een potentieel medicijn te testen. Op deze manier willen we de kwaliteit van leven van de patiënten met nemaline myopathie verbeteren. Dit wordt op de volgende manier onderzocht.

Pathofysiologie

Nemaline myopathie is de meest voorkomende aangeboren spierziekte binnen de groep van aandoeningen waarin verstoringen in het samentrekken van de spier leiden tot spierzwakte. Vandaag de dag zijn we op de hoogte van 10 genen die betrokken zijn bij het ontstaan van nemaline myopathie. Er is echter nog geen medicijn voor handen. Om het inzicht in twee veelvoorkomende vormen van nemaline myopathie te vergroten, hebben we in twee verschillende muismodellen het betrokken eiwit gelabeld met een fluorescente probe. Van deze twee eiwitten, die de oorzaak zijn in het ontstaan van de ziekte, is nauwelijks bekend welke rol ze precies spelen. Door de eiwitten zichtbaar te maken middels fluorescentie, komen we te weten (1) waar de eiwitten zich bevinden in de cel, en (2) bij welke processen ze betrokken zijn. De skeletspier bestaat uit een zeer vernuftig raderwerk dat exact op elkaar is ingesteld om de spieren in beweging te brengen. De preciese plek van een eiwit in dit raderwerk voorspelt de rol die het eiwit speelt bij het genereren van kracht. Van twee eiwitten die vaak verstoord zijn bij nemaline myopathie, weten we niet precies waar deze eiwitten zich bevinden in het raderwerk. Als we deze informatie kunnen verkrijgen middels de fluorescente probe waarmee we de desbetreffende eiwitten kunnen labelen, vergroot dat ons inzicht in waarom deze spieren met aangedane eiwitten minder kracht kunnen leveren. Ook levert deze informatie hiermee aangrijpingspunten op voor therapieën om de spierkracht te herstellen. Zo vergroten we het inzicht in de pathofysiologie van nemaline myopathie.

Testen medicijn

Onlangs hebben we op *geïsoleerde individuele spiercellen* van nemaline myopathie patiënten een veelbelovende stof getest, een spieractivator, die de spierkracht aanzienlijk verbeterde. Om de stap te maken naar het testen van deze stof in nemaline myopathie patiënten is meer preklinisch werk noodzakelijk. We weten namelijk nog niet wat het effect van de spieractivator is op *intacte spieren* in nemaline myopathie. We verwachten dat de muizen bij gebruik van een spieractivator meer spierkracht kunnen leveren bij submaximale inspanning, en zuiniger met hun energie om kunnen gaan waardoor ze uiteindelijk minder last hebben van vermoeidheid. Om de belangrijke volgende stap naar de haalbaarheid van een spieractivator voor toekomstig gebruik in nemaline myopathie te testen, zijn we genooddaakt om het op effect intacte spieren en *in vivo* functie te bepalen. Daarom hebben we muismodellen gemaakt voor vijf verschillende vormen van nemaline myopathie. We hebben gekozen voor deze vijf modellen, omdat deze qua genetica vijf vormen van nemaline myopathie representeren die vaak voorkomen. Daarnaast zijn deze modellen interessant, omdat het verschillende vormen van ernst van spierzwakte betreft. Zo zijn sommige modellen mild qua spierzwakte, en andere zeer zwaar aangedaan. Door het verschil in spierzwakte zullen de tijdstippen waarop de dieren gemeten zullen worden dus ook verschillen. Onderstaande tabel geeft precies aan op welke leeftijd de verschillende modellen gemeten

worden; een tijdstip waarop het dier duidelijk spierzwakte vertoont ten opzichte van controle dieren.

Genotype	Leeftijd
<i>Acta1</i> (H40Y)	~3 maanden
Tg(<i>Acta1</i>)Asp286Gly	~4 maanden
<i>Neb</i> -cKO	~4 maanden
██████-KO	~6 maanden
██████-KI (Dutch founder mutation)	~6 maanden

Op alle muizen zullen we drie belangrijke bepalingen doen om inzicht te krijgen in het effect van een spieractivator:

We bestuderen het effect van een spieractivator op (1) *in vitro* intacte spierfunctie, (2) *in vivo* uithoudingsvermogen en (3) *in vivo* ademhalingsfunctie.

De studie is opgedeeld in twee delen: eerst testen we het effect van *acute* toediening van een spieractivator op de bovengenoemde uitkomstmaten. Als deze studies significante verbetering van spierfunctie en uithoudingsvermogen laten zien, starten we de *chronische* studies waarbij een spieractivator wordt toegevoegd aan het voer.

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

Pathofysiologie

Om het inzicht in twee veelvoorkomende vormen van nemaline myopathie te vergroten, hebben we in twee verschillende muismodellen het betrokken eiwit gelabeld met een fluorescente probe. De lokalisatie en rol van deze eiwitten kunnen we bestuderen middels super-resolutie microscopie.

Testen medicijn

Nemaline myopathie komt voor in verschillende gradaties, mede omdat mutaties in verschillende genen kunnen leiden tot de spierziekte. We hebben de beschikking over vijf muismodellen voor nemaline myopathie, die verschillende mutaties dragen en voor zowel milde als ernstige varianten van de ziekte staan. Op deze dieren worden in totaal drie verschillende proeven gedaan (met cross-over design) om het effect van een spieractivator op intacte spierfunctie te onderzoeken.

In vivo: uithoudingsvermogen

Om te onderzoeken of toediening van een spieractivator de algemene prestatie van de muis verbetert zullen we de dieren op een loopband plaatsen en hun uithoudingsvermogen testen. Met een cross-over design zullen we het effect van een spieractivator op looptijd bestuderen.

In vivo: ademhalingsfunctie

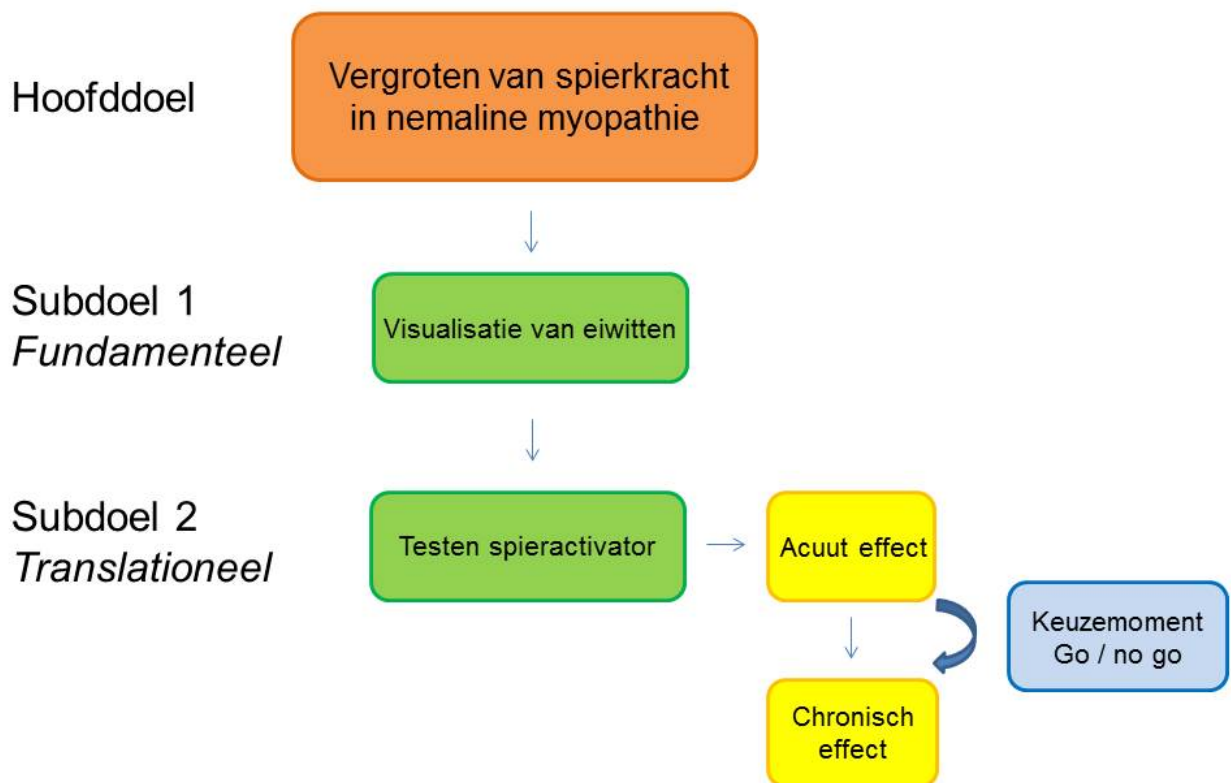
Met name de ademhalingsspier (het diafragma) is vaak het meest aangedaan in nemaline myopathie, en falen van deze spier is in veel gevallen de doodsoorzaak. Om te onderzoeken of het *in vitro* effect op geïsoleerde diafragmaspiercellen te extrapoleren is naar verbetering van *in vivo* condities, meten we ademhalingsfunctie *in vivo* met behulp van plethysmografie.

In vitro: intacte spierfunctie

Het diafragma en perifere spieren worden gedissecteed voor intacte mechanica experimenten. Voor alle spieren zullen we tweemaal een standaard protocol voor spierfunctie draaien voor het bepalen van de (sub)maximale kracht, de vermoeibaarheid van de spier en de calciumhuishouding: eenmaal in aanwezigheid van een spieractivator, eenmaal met alleen placebo (met middel waarin een spieractivator is opgelost).

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.

Het specifieke hoofddoel is het vergroten van spierkracht bij patiënten met nemaline myopathie. Om dit te bereiken moeten we allereerst weten wat er mis gaat in de spier om therapeutische aangrijpingspunten te identificeren. Subdoel 1 – beschreven in volgnummer 1 – heeft als doel de locatie en functie van eiwitten die betrokken zijn bij spierzwakte in nemaline myopathie in kaart te brengen, zodat we inzicht krijgen in de oorzaak van spierzwakte. Als het fundamentele werk is afgerond en we hebben aangetoond dat verstoringen in de locatie en functie van deze eiwitten spierzwakte veroorzaken in nemaline myopathie, dan kunnen we aanvangen met het versterken van de functie van deze eiwitten middels therapeutische interventie– beschreven in volgnummer 2. Dit betreft translationele experimenten waarbij het effect van een potentieel medicijn getest wordt dat beoogt spierkracht te verhogen. Het flowdiagram geeft de samenhang tussen de verschillende onderdelen aan.



Pathofysiologie

De nog onbekende rol van twee belangrijke eiwitten die betrokken zijn bij skeletspierzwakte zal worden opgehelderd door ze fluorescent te labelen en functie in kaart te brengen (volgnummer 1).

Testen medicijn

Om spierzwakte in skeletspieren tegen te gaan zal het effect van een spieractivator getest worden op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen.

Fase 1: acuut effect

Eerst zal het effect van *acuut* toedienen van een spieractivator worden getest op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen (volgnummer 2).

Fase 2: chronisch effect

Als dit tot significante verbetering van spierfunctie leidt, wordt ook het *chronische* effect van een spieractivator getest op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen (volgnummer 2).

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Visualisatie van skeletspiereiwitten
2	<i>In vitro</i> en <i>in vivo</i> skeletspierfunctie
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] AMSTERDAM
[REDACTED]

**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
AVD114002016501
Bijlagen
1

Datum 20 mei 2016
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?" met aanvraagnummer AVD114002016501. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6, 11 en 18 mei 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betreft de samenhang tussen de aangevraagde Bijlagen Dierproeven en een nieuwe NTS.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende het afstemmen van de go/no go momenten met de IvD wordt gesteld om onnodige inzet van dieren in dierproeven te voorkomen. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 mei 2016 tot en met 1 mei 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-VU-VUMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 31 maart 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. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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


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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: Vrije Universiteit Medisch Centrum
Adres: De Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 mei 2016 tot en met 1 mei 2021, voor het project "Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?" met aanvraagnummer AVD114002016501, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-VU-VUMC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 mei 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 maart 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 31 maart 2016, ontvangen op 31 maart 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6, 11 en 18 mei 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Visualisatie van skeletspiereiwitten	Muizen (Mus musculus) / knock-in en wt	400	Licht	
In vitro en in vivo skeletspierfunctie	Muizen (Mus musculus) / Wt en NM	320	Matig	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.