

	Inventaris Wob-verzoek W17-12								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS20172144	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Vraag en antwoord aanvraag				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	

1190020172144

14 JUN 2017



Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in	11400
		☐ 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) te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	64156338
		Straat en huisnummer	de Boelelaan 1117
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>	Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☒ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☒ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters

☐ Dhr. ☐ 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 sept 2017

Einddatum 31 aug 2022

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Herstel van lekkende haarvaten om de doorbloeding van organen te verbeteren en orgaanschade te voorkomen

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum

Postadres

Amsterdam Nederland

E-mailadres

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur*

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.

Inkoopordernummer: 4684861

Factuuradres: VU medisch centrum, [REDACTED]
De Boelelaan 1117
1081 HV Amsterdam

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☒ Melding Machtiging

☒ Bijlage 1 en 2 Beschrijving dierproeven

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

12-06-2017

Handtekening

[REDACTED]



Format

Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. 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. | VU medisch centrum Amsterdam |
| 1.3 | Vul de titel van het project in. | Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten |

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

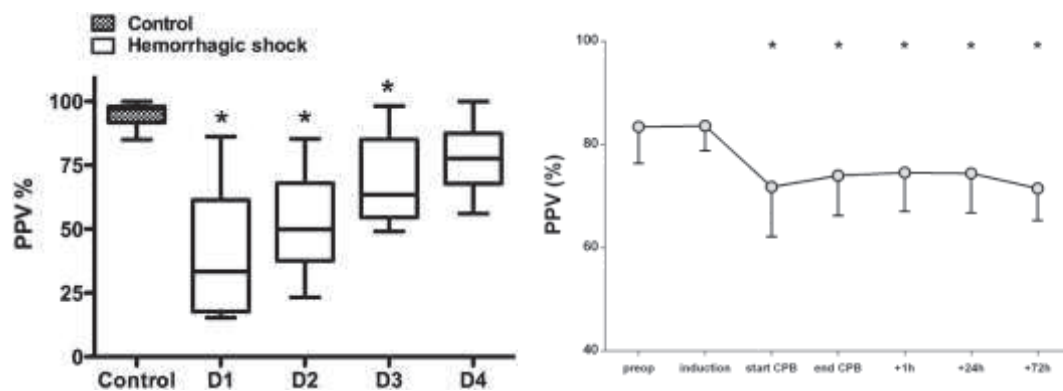
Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

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

De doorbloeding van de microcirculatie is een belangrijk onderdeel van de bloedsomloop. De microcirculatie bestaat uit de haarvaten (capillairen) waarin de uitwisseling van zuurstof, koolstofdioxide, voedingsstoffen en afvalstoffen met de omliggende organen plaatsvindt. Vermindering van de doorbloeding van deze haarvaten kan leiden tot een tekort aan zuurstof en voedingsstoffen en opstapeling van afvalstoffen in de omliggende weefsels en uiteindelijk tot het falen van de organen.

Een verstoorde doorbloeding van de haarvaten is kenmerkend bij ernstig zieke patiënten. [REDACTED]

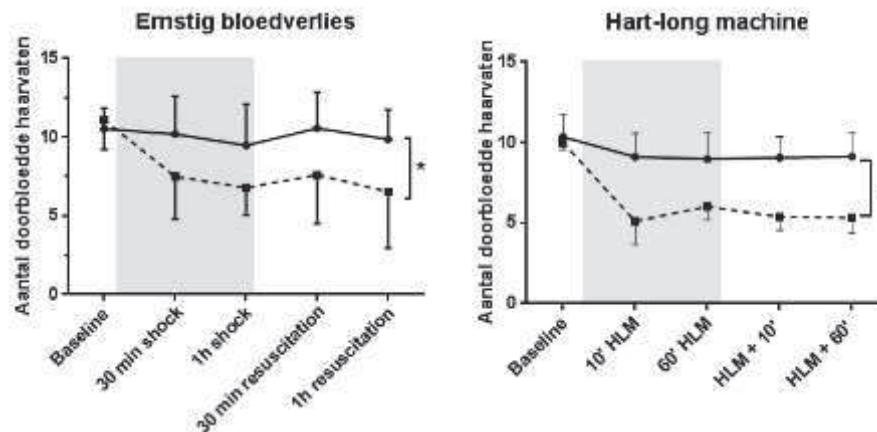
[REDACTED] Deze doorbloedingsstoornissen in de haarvaten zijn geassocieerd met het falen van verschillende organen, zoals het acuut falen van de nier (1 op de 7 patiënten) en het acuut falen van de long (1 op de 6 patiënten) en een ongunstige prognose voor de patiënten.



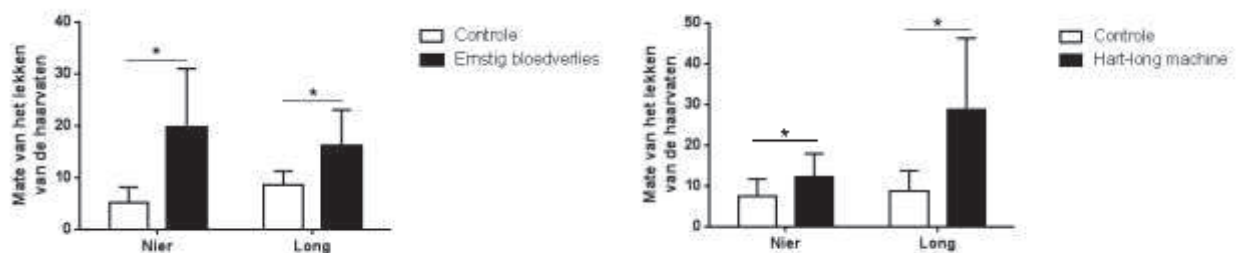
Het **doel** van ons onderzoek is het bestuderen hoe een slechte doorbloeding van de haarvaten kan leiden tot het falen van verschillende organen in ernstig zieke patiënten om vervolgens aangrijpingspunten te vinden en de behandeling te optimaliseren. De huidige behandeling van deze patiënten is gericht op de macrocirculatie, zoals het herstellen van de bloeddruk en de hartslag. Maar juist verstoringen in de microcirculatie (haarvaten) zijn een belangrijke voorspellende factor voor het ontwikkelen van orgaan falen in ernstig zieke patiënten. Helaas bereikt de huidige therapie van deze patiënten nog niet de haarvaten. Met dit onderzoek willen wij nieuwe aangrijpingspunten vinden om de haarvaten te bereiken en de doorbloeding te optimaliseren om uiteindelijk het falen van de organen te verminderen of voorkomen.

Onze onderzoeksgroep heeft eerder laten zien dat de stoornissen in de doorbloeding van de haarvaten in ernstig zieke patiënten gepaard gingen met activatie van de binnenwand van de haarvaten (endotheel), met een dunnere slijmlaag over deze binnenwand (glycocalyx) en een verstoorde balans van het moleculaire [REDACTED] systeem. Tevens hebben celweek experimenten laten zien dat als we humane endotheel cellen blootstellen aan het plasma van deze patiënten de barrière functie verslechtert, wat een indicatie kan zijn dat er markers in het bloed circuleren waardoor de haarvaten gaan lekken. Helaas is het onderliggende mechanisme van de doorbloedingsstoornissen bijna onmogelijk in humaan weefsel te onderzoeken, omdat de huidige technieken om doorbloedingsstoornissen in kaart te brengen nog beperkt zijn. Door deze beperkingen hebben wij ons onderzoek uitgebreid met proefdieren. Wij hebben twee diersmodellen werkend in ons laboratorium welke representatief zijn voor deze ernstig zieke patiënten, [REDACTED]

hebben wij laten zien dat de doorbloeding van de haarvaten verstoord is (zie figuur 2), maar ook niet hersteld kon worden door de huidige behandelingsmethode.



Daarnaast hebben wij laten zien dat deze verstoringen gepaard gingen met het lekken van vloeistof uit de haarvaten in het omliggende weefsel; e.g. vaatlekkage (zie figuur 3).

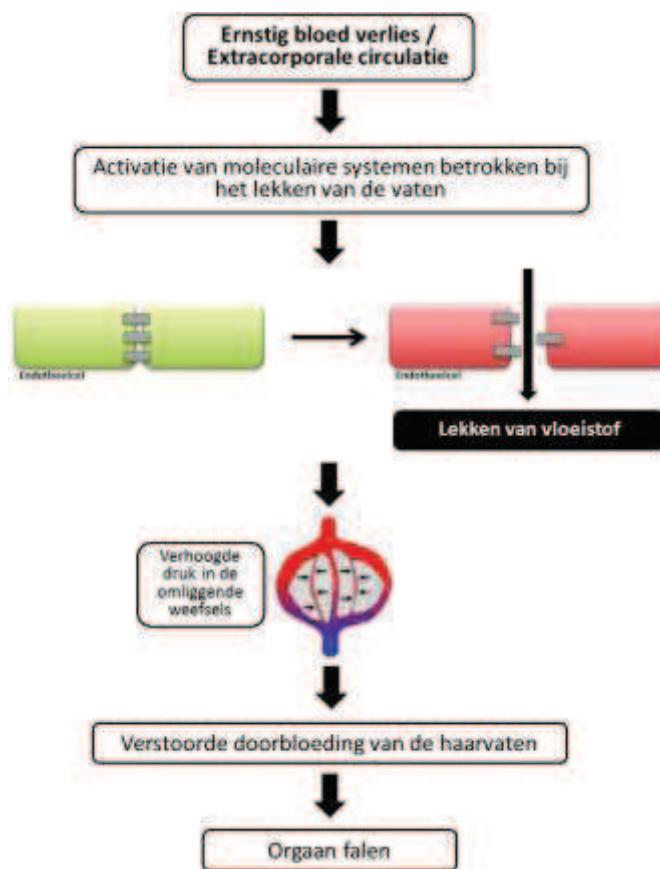


Eén van de moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten is het moleculaire **VEGF** systeem. Wij hebben aangetoond dat het beïnvloeden van het **VEGF** systeem met een nieuwe medicatie de doorbloeding van de haarvaten herstelt in ernstig zieke ratten. Tevens hebben wij laten zien dat deze medicatie het lekken van de haarvaten verminderde. Omdat elk orgaan tijdens stress een andere doorbloeding heeft (bv. vitale organen krijgen voorrang op niet-vitale organen) zullen wij in ons vervolgonderzoek het effect van deze behandeling bestuderen in specifieke organen zoals de longen en de nieren. Daarnaast is bekend dat organen gaan falen binnen 3 dagen **na shock**. Verder onderzoek is daarom nodig om aan te tonen of het beïnvloeden van dit systeem ook op lange termijn effectief is. Hiervoor hebben wij twee beurzen ontvangen.

Naast het **VEGF** systeem zijn er ook andere systemen bekend die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten. Het **fundamentele** onderzoek van dit project focust op het ontrafelen van deze systemen met als doel aangrijpingspunten te vinden voor nieuwe medicatie of het toepassen van

Het **translationele** karakter van ons onderzoek is het uiteindelijk toepassen van nieuwe en/of bestaande medicatie met een nieuw doel in de kliniek. Wij hebben al laten zien dat de doorbloeding van de haarvaten verstoord is in ernstig zieke patiënten (zie figuur 1) en twee medicaties waarvan wij de werking hebben laten zien in ratten worden momenteel getest in deze patiënten.

Hypothese



Uiteindelijk wordt het effect van de interventies met de grootste potentie om orgaan falen te verminderen op langere termijn bestudeerd. Ernstig zieke patiënten ontwikkelen de meeste complicaties op de Intensive Care en orgaan falen gemiddeld binnen drie dagen ■■■■■■

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4

5. dit project antwoord(en) te verschaffen?
In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Algemene doelstelling

Het vinden van nieuwe aangrijpingspunten om het lekken van de haarvaten te voorkomen of herstellen en uiteindelijk de doorbloeding van de haarvaten te optimaliseren ter vermindering van orgaan falen.

Onderzoeksvragen:

1. Welke moleculaire systemen zijn betrokken bij het lekken van de haarvaten in ernstig zieke dieren?
2. Wat is het effect van het remmen of activeren van de moleculaire systemen gevonden bij vraag 1 op de doorbloeding van de haarvaten en de orgaan functie?
3. Wat is het effect van de bij vraag 2 positief geteste interventies op orgaan functie op de lange termijn?

Haalbaarheid

Binnen onze onderzoeksgroep en ons onderzoeksinstituut is ruime ervaring met de verschillende diermodellen, [REDACTED]

[REDACTED]. Onze kennis over de diermodellen is gedocumenteerd in 7 papers.

De technieken om de doorbloeding en het lekken van de haarvaten te meten worden al met succes toegepast binnen onze onderzoeksgroep. De doorbloeding wordt gemeten met intravitaal microscopie [REDACTED] en contrast echografie in de nieren en het hart. Het lekken van de haarvaten wordt gemeten door middel van uittreding van een blauwe kleurstof vanuit de vaten in de omliggende weefsels. Het meten van het lekken van de vaten, de doorbloeding van de renale haarvaten en de oxygenatie van de nier wordt op het moment uitgebreid met twee-foton microscopie en hyperspectraal imaging in samenwerking met andere onderzoeksgroepen, zowel binnen als buiten ons instituut.

Voor het fundamentele onderzoek hebben wij verschillende technieken werkzaam, zoals PCR, western blotten, immunohistologie, ELISA en celweek, om de veranderingen op RNA en eiwit niveau te bestuderen in de verschillende organen. Het beschreven onderzoek wordt uitgevoerd door 2 promovendi, een postdoc en wordt praktisch ondersteund door een research analist.

Voor het beantwoorden van de hierboven beschreven vraagstellingen hebben wij twee beurzen ontvangen voor het bestuderen van het effect van het lekken van de haarvaten op de doorbloeding van de haarvaten en het ontstaan van orgaan falen [REDACTED]

3.3 Belang

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

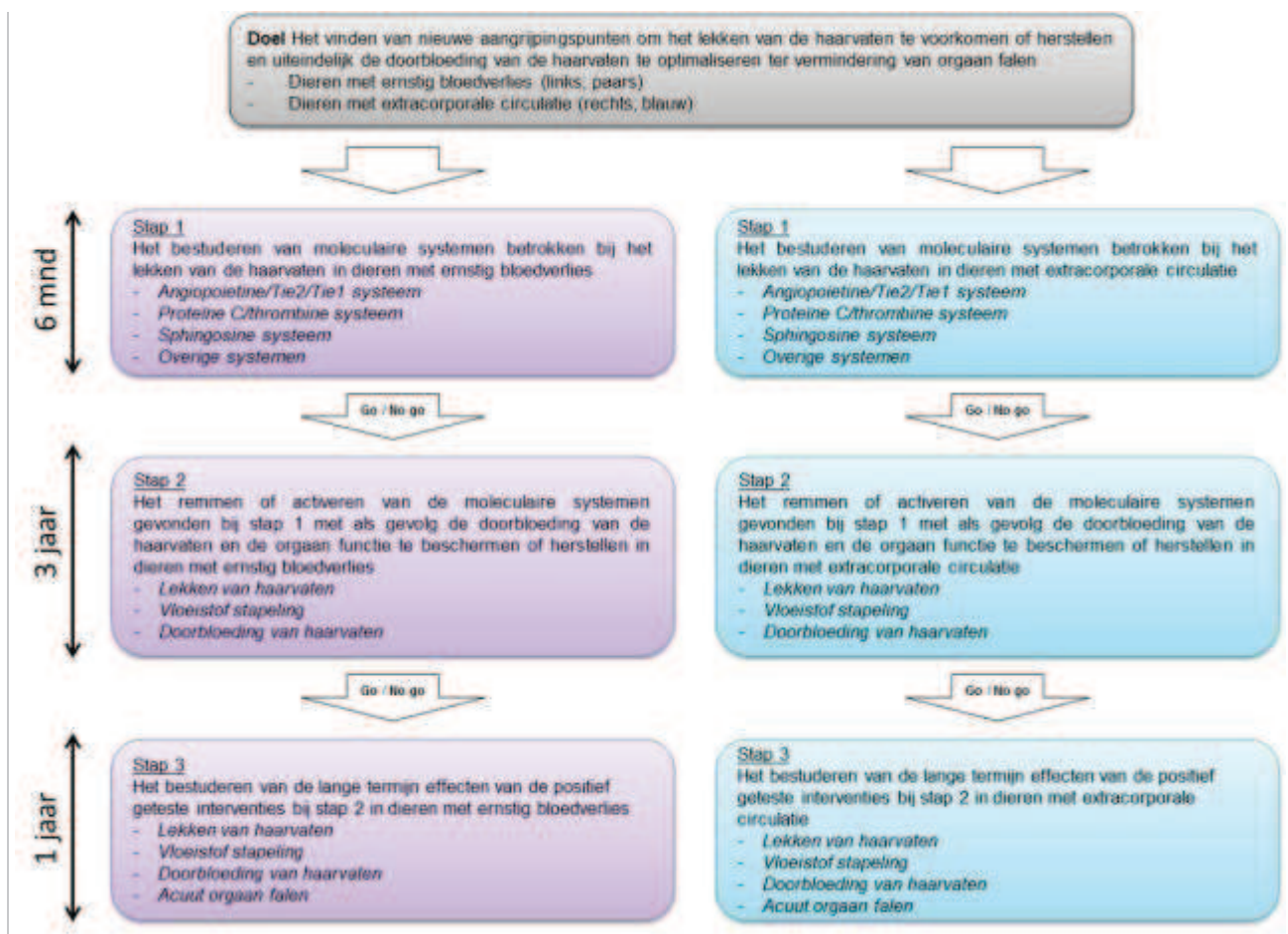
Het **maatschappelijke** belang van deze studie ligt in het bijdragen van kennis voor het optimaliseren van de behandeling van ernstig zieke patiënten met verstoringen in de doorbloeding van de haarvaten. Op dit moment is de behandeling van ernstig zieke patiënten gericht op het herstellen van de macrocirculatie (o.a. bloeddruk, hartslag). Echter, er zijn er geen effectieve therapieën beschikbaar die aangrijpen op de microcirculatie, terwijl de laatste jaren gebleken is dat juist verstoringen in de microcirculatie belangrijk zijn voor het ontwikkelen van orgaan falen (15% acuut nier falen, 16% acuut long falen) in ernstig zieke patiënten, [redacted]

De beschreven diermodellen zullen hierbij van belang zijn omdat zij vertaalbaar zijn naar de humane situatie. Wij hebben aangetoond dat in onze diermodellen dezelfde veranderingen plaatsvinden in de doorbloeding van de haarvaten en veranderingen van markers in het bloed als in ernstig zieke patiënten (zie ook figuur 1 en 2). Daarnaast worden momenteel twee medicaties waarvan wij de werking hebben laten zien in ratten getest in ernstig zieke patiënten, wat de extrapolatie van het project ondersteunt.

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

Wij hebben gekozen om de eerste twee patiëntpopulaties te bestuderen.

Deze twee diermodellen zullen naast elkaar ingezet worden om de onderzoeksvragen te beantwoorden.



Stap 1: Het bestuderen van moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten

Na 1 uur worden de dieren behandeld met vloeistof volgens de standaard behandeling in de kliniek.

Op twee momenten worden de dieren opgeofferd:

De nieren, de longen en het plasma worden bestudeerd op moleculair niveau (RNA en eiwit). Verschillende moleculaire systemen die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten zullen worden bestudeerd, zoals:

1. [] systeem
2. Proteïne C/thrombine systeem
3. Sphingosine systeem
4. Overige (onbekende) systemen (vascular endothelial growth factor, intergrinen)

Veranderingen in deze moleculaire systemen zijn de basis voor het vinden van nieuwe targets voor medicatie om de doorbloeding van de haarvaten en de orgaanfunctie te verbeteren.

Stap 2: Het remmen of activeren van de moleculaire systemen gevonden bij vraag 1 met als gevolg de doorbloeding van de haarvaten en de orgaan functie te beschermen of herstellen

Nadat de moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten [REDACTED] in kaart zijn gebracht, zullen we interfereren in deze moleculaire systemen. De meest relevante eiwitten of genen zullen we stimuleren of remmen met bestaande interventies. Dit kunnen bv. medicijnen zijn die in een andere context (ander ziektebeeld) worden gebruikt. De effecten van deze interventies worden bestudeerd op het lekken van de haarvaten, het stapelen van vloeistof in de omliggende weefsels en de doorbloeding van de haarvaten. Het aantal te testen interventies schatten wij op 6 in een periode van 3 jaar in verband met de tijd die deze experimenten in beslag zullen nemen en de capaciteit van onze onderzoeksgroep.

Stap 3: Het bestuderen van de lange termijn effecten van de positief geteste interventies bij vraag 2

Het effect van de interventies met de grootste potentie om orgaan falen te verminderen zullen op langere termijn bestudeerd worden. Ernstig zieke patiënten ontwikkelen de meeste complicaties op de Intensive Care (dag 1) en orgaan falen gemiddeld binnen drie dagen [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]

De periode kenmerkend voor de Intensive Care zal bestaan uit het bestuderen van het effect van de interventie in geseedeerde dieren tot 6 uur [REDACTED]

[REDACTED] In de tweede fase worden de dieren bijgebracht uit de sedatie en worden vervolgd voor meerdere dagen [REDACTED] In deze dieren worden de nieren, de longen en het plasma bestudeerd op markers van acuut nier falen en acuut long falen.

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

Diermodellen

Stoornissen in de doorbloeding van de haarvaten zijn kenmerkend voor ernstig zieke patiënten. Twee diermodellen die representatief zijn voor ernstig zieke patiënten zijn dieren [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] en vervolgens worden de muizen behandeld met vloeistof tot de bloeddruk van de start van de procedure weer is bereikt. De muizen worden nog 1 uur na herstel van de macrocirculatie (bloeddruk, hartslag) vervolgd. Gedurende de eerste 2 fases van het onderzoek zijn de muizen de gehele periode onder narcose en wordt er aanvullend perioperatieve pijnbestrijding gegeven. In de derde fase van het onderzoek worden de muizen bijgebracht uit de narcose zodra de macrocirculatie herstelt is [REDACTED] (ongeveer een uur na start standaard behandeling met vocht) en zullen worden vervolgd voor meerdere dagen.

[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED] is het meest vertaalbaar naar de klinische situatie. Echter heeft een exponentiële toename in het verlies van het aantal muizen en het niet kunnen beïnvloeden van de diepte [REDACTED], waardoor er een grotere variatie in de groepen aanwezig en meer dieren nodig zijn om een effect aan te tonen tot de beslissing geleid [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] en worden de ratten nog 1 uur vervolgd onder narcose (of langer zoals beschreven bij onderzoeksvraag 3). Gedurende de eerste 2 fases van het onderzoek zijn de ratten de gehele periode onder narcose en wordt er aanvullend perioperatieve pijnbestrijding gegeven. In de derde fase van het onderzoek worden

de ratten [REDACTED] bijgebracht uit de narcose zodra de macrocirculatie stabiel is (ongeveer een uur [REDACTED] en vervolgd voor meerdere dagen.

Er is gekozen om de ratten voor 75 minuten [REDACTED] omdat dit de gemiddelde periode is dat een patiënt [REDACTED]

Het [REDACTED] is helaas niet mogelijk in de muis. Dit heeft te maken met het volume [REDACTED] en de verdunning die in de dieren plaats vindt. Mogelijkheden voor een kleinere [REDACTED] zijn helaas nog niet haalbaar. Dit beperkt ons in het bestuderen van de betrokken moleculaire systemen, maar gelukkig zijn er interventies mogelijk zoals het toedienen van siRNA of andere inhibitoren of stimulatoren.

Moleculaire analyses

De primaire uitkomst bij onderzoeksvraag 1 zijn veranderingen in de moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten. Op 2 tijdstipmomenten zullen de dieren getermineerd worden en wordt weefsel gebruikt om de veranderingen op moleculair niveau in kaart te brengen.

Lekken van de haarvaten

Onze hypothese is dat de doorbloeding van de haarvaten verstoord is doordat de haarvaten lekken. Het lekken van de haarvaten wordt over de tijd bestudeerd. Onder narcose zullen de metingen op 5 momenten uitgevoerd worden om inzicht te krijgen wanneer de vaten gaan lekken en welke factoren hier aan bijdragen.

Vloeistof stapeling

Onze hypothese is dat door het lekken van vloeistof uit de haarvaten in het omliggende weefsel een verhoogde druk ontstaat wat resulteert in het dichtdrukken van de haarvaten en het belemmeren van de doorbloeding van de haarvaten. Het stapelen van vloeistof zal indirect gemeten worden door de drukopbouw in het weefsel te meten. De methode die hiervoor gebruikt wordt meet continue de druk in het weefsel en dit zal ons een indicatie geven hoe de druk opgebouwd wordt en wanneer dit effect heeft op de doorbloeding van de haarvaten.

Doorbloeding van de haarvaten

De doorbloeding van de haarvaten is de primaire uitkomst parameter bij onderzoeksvraag 2 en wordt met verschillende technieken in verschillende organen gemeten. We hebben gekozen om verschillende technieken te gebruiken omdat technieken vaak maar in 1 orgaan toepasbaar zijn. Onder narcose zullen de metingen op verschillende momenten uitgevoerd worden om inzicht te krijgen wanneer de doorbloeding verstoord raakt en welke factoren hier aan bijdragen.

Orgaan falen

Als gevolg van een verstoorde doorbloeding zullen de omliggende weefsels minder of geen zuurstof krijgen (hypoxie) wat uiteindelijk leidt tot het falen van de organen. Markers voor orgaan falen zijn de primaire uitkomst maten bij onderzoeksvraag 3. Deze markers zullen bepaald worden in het bloed, welke op 3 verschillende momenten tijdens het experiment afgenomen zal worden. Daarnaast worden er moleculaire analyses uitgevoerd in de organen van interesse, zoals de nieren en de longen. Dit vereist terminatie van de dieren aan het einde van het experiment.

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.

Onderzoeksvraag 1 is gericht op het bestuderen van de moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten. Voor het uitvoeren van deze experimenten is een periode geschat van 6 maanden op basis van het feit dat beide diermodellen en de technieken voor de moleculaire analyses al lopend binnen onze onderzoeksgroep.

Omdat veranderingen in moleculaire systemen betrokken bij het lekken van de haarvaten de basis zijn voor het vinden van nieuwe aangrijpingspunten zal vervolgens het eerste Go / No go moment

plaatsvinden (zie figuur 6). Of we doorgaan naar de tweede onderzoeksvraag zal bekeken worden per moleculair systeem. Met betrekking tot het [REDACTED] systeem en het proteïne C/thrombine systeem hebben wij aangetoond dat modulatie van deze systemen [REDACTED] [REDACTED]) de doorbloeding van de haarvaten kunnen herstellen of beschermen. De verwachting is dan ook zeer groot dat we op basis van de te verwachten bevindingen door kunnen gaan naar onderzoeksvraag 2. De overige moleculaire systemen worden in hetzelfde weefsel onderzocht en hiervoor zullen dus geen extra dieren getermineerd worden.

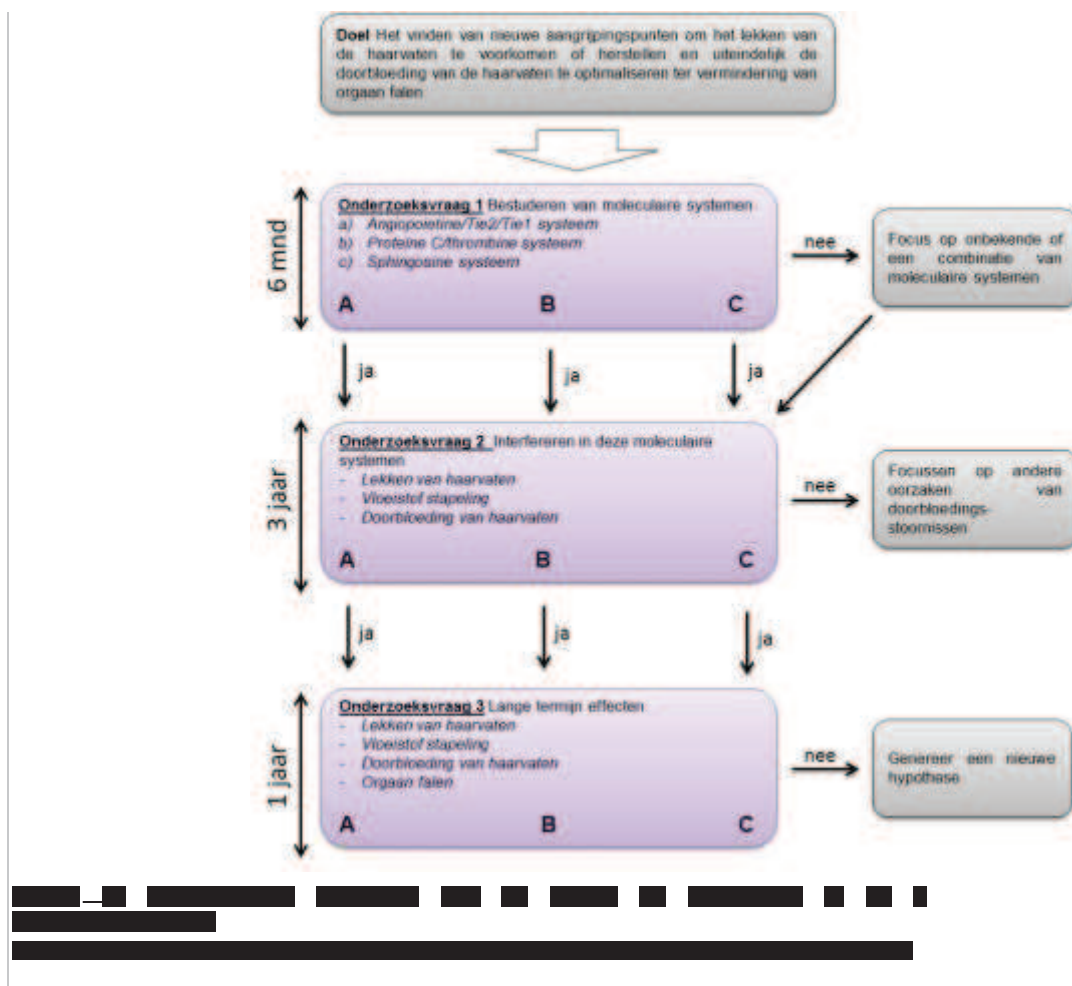
Onderzoeksvraag 2 richt zich op het interfereren in deze moleculaire systemen door bepaalde eiwitten of genen te stimuleren of remmen in dezelfde diersystemen zoals beschreven onder onderzoeksvraag 1. De effecten van deze interventies worden bestudeerd op het lekken van de haarvaten, het stapelen van vloeistof in de omliggende weefsels en de doorbloeding van de haarvaten. Deze periode zal het grootste gedeelte van de tijd in beslag nemen omdat het bijvoorbeeld tijd kost om transgene muizen te importeren of ons model bij een andere onderzoeksgroep uit te voeren.

Het tweede Go / No go moment is gebaseerd op het effect van deze interventies op de doorbloeding van de haarvaten, aangezien dit de belangrijkste bepalende parameter is voor het ontwikkelen van orgaan falen. We gaan door naar onderzoeksvraag 3 op het moment dat de interventie de doorbloeding van de haarvaten beschermt of herstelt. Het Go / No go moment zal per interventie bekeken worden. Van belang is dat onderscheid wordt gemaakt tussen interventies met als doel de doorbloeding van de haarvaten te herstellen (mogelijke medicatie) of interventies met een negatief effect om het belang van bepaalde moleculaire systemen aan te tonen.

Bij onderzoeksvraag 3 zullen we de dieren bij laten komen uit de narcose als we geen negatieve effecten zien van de interventie op het ontwikkelen van orgaan falen.

Een voorbeeld is dat wij hebben laten zien dat stimulatie van het [REDACTED] systeem door toediening van een medicijn met vergelijkbare werking als [REDACTED] het lekken van de haarvaten vermindert en de doorbloeding van de haarvaten herstelt in ernstig zieke dieren. De positieve resultaten van deze [REDACTED] analoog op de doorbloeding van een haarvaten is een Go voor verder onderzoek. Tegelijkertijd willen wij uitzoeken of deze [REDACTED] analoog daadwerkelijk via het [REDACTED] systeem werkt door [REDACTED] te remmen. Het remmen van [REDACTED] heeft een negatief effect en wordt niet gezien als interventie voor een Go /No go beslissing omdat dit geen interventie is met als doel dat het een nieuw medicijn is in deze context.

Aangezien verschillende moleculaire systemen bestudeerd worden is het mogelijk dat de onderzoeksvragen 1 t/m 3 gedeeltelijk zullen overlappen (bv. wij hebben al aangetoond dat het [REDACTED] systeem betrokken is bij een slechtere doorbloeding van de haarvaten en kunnen al met stap 2 doorgaan, terwijl andere moleculaire systemen nog in stap 1 bestudeerd moeten worden). Logischerwijs worden per moleculair systeem en per interventie dezelfde Go / No go criteria aangehouden.



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

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



Bijlage

Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. 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. | VU medisch centrum Amsterdam | | | | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | <table border="1" style="border-collapse: collapse; width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Volgnummer</th> <th style="text-align: left;">Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">1</td> <td style="padding: 2px;">[REDACTED]</td> </tr> </tbody> </table> | Volgnummer | Type dierproef | 1 | [REDACTED] |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | | |
| 1 | [REDACTED] | | | | | |

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.

Diermodel	1. Ernstig bloedverlies
Moleculaire systemen	1. Angiopoietine/Tie2/Tie1 systeem 2. Proteïne C/thrombine systeem 3. Sphingosine systeem 4. Overige systemen
Lekken van haarvaten	1. Extravasatie van blauwe kleurstof 2. Twee-foton microscopie nier
Vloeistof stapeling	1. Millar catheter
Doorbloeding haarvaten	1. Intravitaal microscopie cremaster 2. Contrast echografie nier en hart 3. Twee-foton microscopie nier
Orgaan falen	1. Hyperspectraal imaging 2. Markers in bloed 3. Histologie 4. RNA/eiwit analyses

Diermodel

Stoornissen in de doorbloeding van de haarvaten zijn kenmerkend voor patiënten [REDACTED]

[REDACTED] Het effect van [REDACTED] wordt bestudeerd in de muis. [REDACTED]

[REDACTED]

en vervolgens worden de muizen behandeld met vloeistof tot de bloeddruk van de start van de procedure weer is bereikt. Gedurende de eerste 2 fases van het onderzoek worden de muizen nog 1 uur na herstel van de macrocirculatie (bloeddruk, hartslag) vervolgd. Wanneer dit succesvol blijkt te zijn zullen de muizen tijdens onderzoeksvraag 3 na het herstellen van de macrocirculatie voor 6 uur onder narcose vervolgd worden. De muizen zijn de gehele periode onder narcose en er wordt aanvullende perioperatieve pijnbestrijding gegeven. Het ongerief is daarom ingeschat op licht.

Mocht de behandeling tijdens deze experimenten positief blijken zullen wij in de laatste fase van onderzoeksvraag 3 de muizen na het herstellen van de macrocirculatie bij laten komen uit de narcose om de dieren vervolgens nog 7 dagen te vervolgen. Aangezien deze experimenten matig ongerief met zich meebrengen zullen de muizen postoperatieve pijnbestrijding ontvangen en zijn er duidelijke humane eindpunten vastgesteld.

Er zijn twee methoden beschreven om [REDACTED] Tijdens

[REDACTED] is het meest vertaalbaar naar de klinische situatie. Echter door een exponentiële toename in het verlies van het aantal muizen en het niet kunnen beïnvloeden van de [REDACTED], waardoor er een grotere variatie in de groepen aanwezig en meer dieren nodig zijn om een effect aan te tonen, hebben wij besloten om shock [REDACTED]

Lekken van de haarvaten

Onze hypothese is dat de doorbloeding van de haarvaten verstoord is doordat de haarvaten lekken. Het lekken van haarvaten kan op meerdere manieren bestudeerd worden.

1. Evans blue extravasatie

Aan het einde van de experimenten, terwijl de muizen nog onder narcose zijn, wordt een blauwe kleurstof (Evans blue) in de circulatie gespoten via een arteriële lijn. Na opofferen wordt de mate van blauw kleuring in de organen bepaald met een spectrofotometer. Het is een simpele techniek waarbij de muizen opgeofferd moeten worden om de mate van blauwkleuring te meten.

2. Twee-foton microscopie

Twee-foton microscopie is een invasieve methode maar heeft als voordeel dat het lekken van de haarvaten over de tijd bestudeerd kan worden. Bij deze techniek wordt onder narcose en pijnstilling een window (een soort raampje) geplaatst in de huid ten hoogte van de nier. Het lekken van de haarvaten wordt in beeld gebracht door het toedienen van fluorescente markers via een veneuze lijn. Een voordeel van deze techniek is dat ook de doorbloeding van de haarvaten over de tijd gemeten kan worden wat uiteindelijk leidt tot vermindering van het aantal muizen.

Vloeistof stapeling

Onze hypothese is dat door het lekken van vloeistof uit de haarvaten in het omliggende weefsel een verhoogde druk ontstaat wat resulteert in het dichtdrukken van de haarvaten en het belemmeren van de doorbloeding van de haarvaten.

1. Interstitiële drukmetingen

Een Millar catheter zal onder narcose en pijnstilling geplaatst worden in de omliggende weefsels, zoals de nieren, om de opbouw in druk over de tijd te meten.

Doorbloeding van de haarvaten

De doorbloeding van de haarvaten wordt met verschillende technieken in verschillende organen gemeten.

1. Intravitaal microscopie [REDACTED]

De doorbloeding van de haarvaten [REDACTED] spier wordt bestudeerd met behulp van intravitaal microscopie. De [REDACTED] wordt onder narcose vrijgeprepareerd aan het begin van een experiment.

████████████████████ Het meten van de doorbloeding ██████████ kan goed gecombineerd worden met het verzamelen van weefsels voor RNA en eiwit analyses omdat er bv. geen contrast middel nodig is.

2. *Contrast echografie*

Een methode om de doorbloeding in meer vitale organen te meten zoals de nieren en het hart is contrast echografie. Met behulp van met gas gevulde bubbels en ultrageluid kunnen in muizen onder narcose verschillen in de doorbloeding tussen organen en over de tijd bestudeerd worden. Daarnaast wordt deze techniek ook gebruikt in patiënten wat de translatie van het meten van de doorbloeding van de haarvaten met deze specifieke techniek naar de patiënten vergroot.

3. *Twee-foton microscopie*

De doorbloeding van de haarvaten in de nier wordt bestudeerd met twee-foton microscopie door het toedienen van fluorescente markers (zie ook 'lekkende van de haarvaten'). Een voordeel van deze techniek is dat onderscheidt gemaakt kan worden in de grootte van de vaten en tegelijkertijd het lekken van de haarvaten in beeld gebracht kan worden. Daarbij kan gebruik gemaakt worden van verschillende molecuulgroottes van de fluorescente markers om meer inzicht te krijgen in de mate van lekkage.

Orgaan falen

Als gevolg van een verstoorde doorbloeding zullen de omliggende weefsels minder of geen zuurstof krijgen (hypoxie) wat uiteindelijk leidt tot het falen van de organen.

1. *Hyperspectraal imaging*

De hyperspectraal camera maakt het mogelijk om oxyhemoglobine en deoxyhemoglobine te meten en de hoeveelheid zuurstof in de weefsels te bepalen in muizen onder narcose. Het voordeel van deze techniek is dat deze ook in de klinische setting gebruikt kan worden.

2. *Markers in bloed*

Tijdens de experimenten wordt er op meerdere tijdstippen bloed afgenomen om eiwitten die een rol spelen bij het falen van de organen te bestuderen in het plasma (bv. met behulp van ELISA's).

3. *Histologie*

Aan het einde van de experimenten worden verschillende organen ingevroren voor verdere moleculaire analyses. Door middel van (immuno)histologie wordt gekeken naar schade in de organen.

4. *RNA/eiwit analyses*

Eiwit en gen expressie profielen worden gemeten met behulp van western blotten en PCR, respectievelijk.

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.

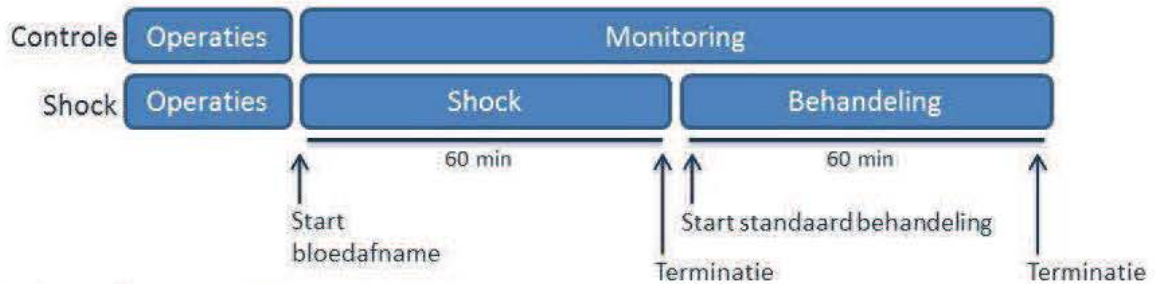
Een schematisch overzicht van de experimenten is weergegeven in figuur 2. De experimenten bestaan uit 2 groepen; een controle groep en een groep waarbij de muizen ██████████ en volgens de huidige (klinische) richtlijnen behandeld worden. De behandeling is gericht op het herstellen van de macrocirculatie (bloeddruk, hartslag) door de muizen vloeistoffen toe te dienen, maar bekend is dat deze behandeling ook leidt tot het lekken van de haarvaten.

████████████████████ De muizen worden na herstel van de macrocirculatie (bloeddruk, hartslag) vervolgd voor 1 uur onder narcose bij onderzoeksvraag 1 en 2, voor 6 uur onder narcose bij onderzoeksvraag 3A of voor 7 dagen na bijkomen uit de narcose bij onderzoeksvraag 3B (zie figuur 2).

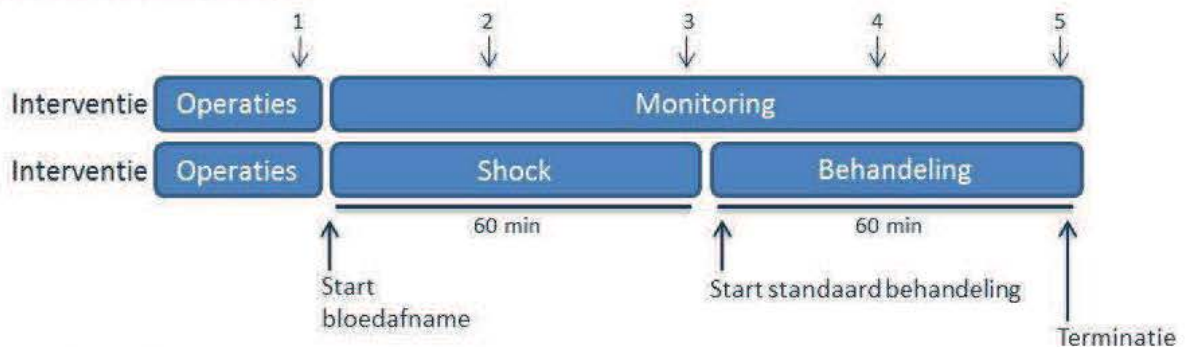
Er is ervaring met het laten bijkomen van muizen uit de narcose ██████████

██████████ De muizen zijn na het bijkomen uit de narcose vervolgd voor 48 uur en in deze periode zijn geen muizen overleden. Wij zullen in onderzoeksvraag 3B de muizen behandelen met bestaande medicatie die toegepast wordt voor andere doeleinden en in onderzoeksvraag 2 en 3A positief zijn gebleken.

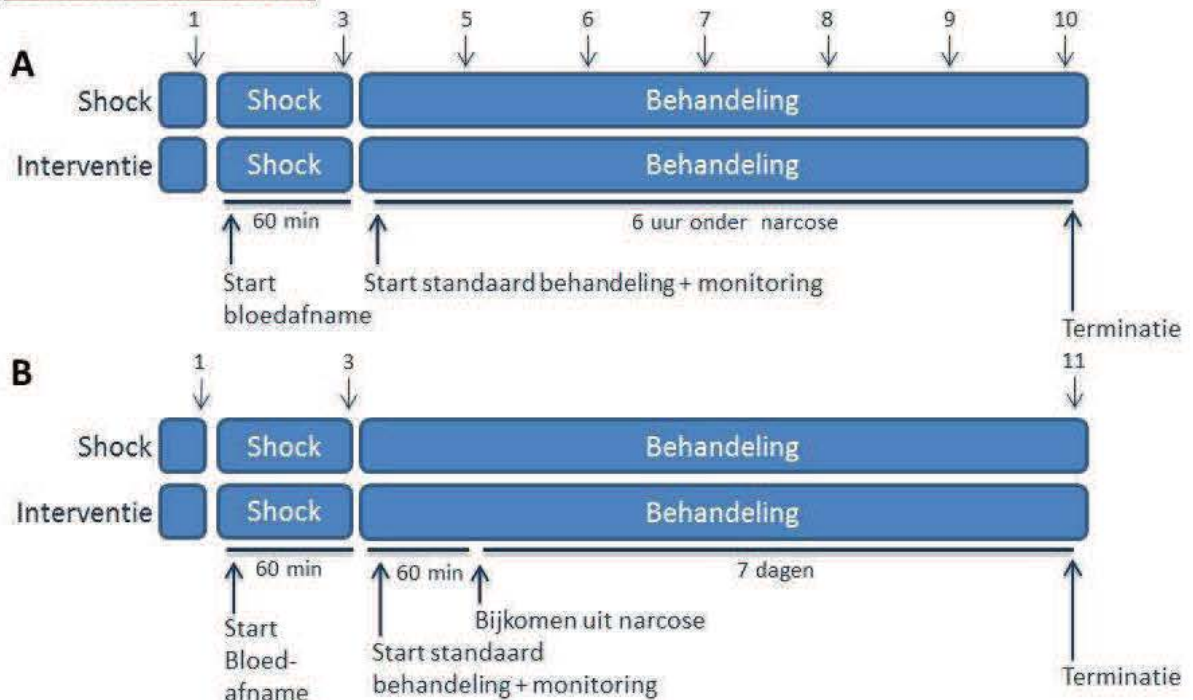
Onderzoeksvraag 1



Onderzoeksvraag 2



Onderzoeksvraag 3



Terminatie:

Bij onderzoeksvraag 1 worden de muizen op 2 momenten getermineerd: 1 uur na [redacted] en 1 uur na de standaard behandeling. Bij onderzoeksvraag 2 en 3 worden de muizen alleen aan het einde van het experiment getermineerd.

Metingen:

De metingen worden verricht op de momenten 1 t/m 11 zoals vermeld in figuur 2. Tijdsmomenten 1 t/m 5: metingen elk half uur en tijdsmomenten 5 t/m 10: metingen elk uur (onderzoeksvraag 3A). Bij onderzoeksvraag 3B zal alleen een meting verricht worden op tijdstippen 1, 3 en 11 (na 7 dagen) in verband met het onder narcose brengen van de muizen. Het gaat hierbij om alle metingen met betrekking tot het lekken van de haarvaten, het stapelen van vloeistof en de doorbloeding van de haarvaten, behalve de uittreding van de blauwe kleurstof omdat dit terminale experimenten betreffen.

Op dezelfde tijdsmomenten zal ook bloed worden afgenomen om circulerende markers te analyseren.

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

De eindpunten van bovenbeschreven onderzoeksvragen zijn:

- 1: moleculaire veranderingen betrokken bij het lekken van de haarvaten
- 2: doorbloeding van de haarvaten
- 3: markers voor orgaan falen

De data verkregen uit de genoemde experimenten zijn numeriek van karakter en zullen worden geanalyseerd met behulp van een student's t-test, one-way of two-way ANOVA met repeated measurements en Bonferroni als post-hoc analyse. De keuze van de statistische analyse hangt af van de te testen parameter en studie opzet.

Onderzoeksvraag 1

De poweranalyse is gebaseerd op een eerder uitgevoerde studie in ratten [REDACTED], waarbij een verlaging van [REDACTED] gen expressie in de nier is gevonden: controle $0,083 \pm 0,030$ a.u. vs. [REDACTED] $0,043 \pm 0,018$ a.u.

$$(n/2)^{1/2} = z_{\alpha/2} - z_k / ((\mu_1 - \mu_2)/\sigma)$$

Waarbij

$$z_{\alpha/2} - z_k = 3,242 \quad (\alpha = 0,05, p = 0,90)$$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (0,083 - 0,043) = 0,04$$

$$\text{variantie } \sigma = 0,024$$

$$(n/2)^{1/2} = 1,945 \rightarrow n=8$$

Met een alfa van 0.05 en beta van 0.9 komen wij dan uit op 8 muizen per groep. Met een uitval van 10% door [REDACTED] en 10% uitval bij de moleculaire analyses gebaseerd op de ervaringen in ratten zijn 9 muizen per groep noodzakelijk.

Onderzoeksvraag 2

De poweranalyse is gebaseerd op een eerder uitgevoerde studie in ratten [REDACTED]. De poweranalyse is gebaseerd op de uitkomsten van meerdere technieken omdat deze technieken niet in 1 dier uit te voeren zijn.

Intravitaal microscopie

Verhoging van het aantal doorbloede haarvaten in [REDACTED] van ratten [REDACTED] met een behandeling gericht op het stimuleren van [REDACTED] $6,53 \pm 3,59$ vs. [REDACTED] met behandeling $9,60 \pm 2,59$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (9,60 - 6,53) = 3,07$$

$$\text{variantie } \sigma = 3,09$$

$$(n/2)^{1/2} = 3,26 \rightarrow n=21$$

Met een alfa van 0.05 en beta van 0.9 komen wij dan uit op 21 muizen per groep. Met een uitval van 10% door te [REDACTED] gebaseerd op de ervaringen in ratten zijn 23 muizen per groep noodzakelijk.

→ De moleculaire analyses worden ook in deze groepen muizen uitgevoerd, zodat hiervoor geen extra muizen nodig zijn.

Extravasatie van blauwe kleurstof

Afname van extravasatie van de blauwe kleurstof in de longen in ratten [REDACTED] met een behandeling gericht op het stimuleren van [REDACTED] $16,08 \pm 6,97$ vs [REDACTED] met behandeling $10,07 \pm 3,30$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (16,08 - 10,07) = 6,01$$

variantie $\sigma = 5,14$

$(n/2)^{1/2} = 2,77 \rightarrow n=16$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 16 muizen per groep. Met een uitval van 10% door te [REDACTED] gebaseerd op de ervaringen in ratten zijn 18 muizen per groep noodzakelijk.

Contrast echografie

De poweranalyse is gebaseerd op artikel van een andere onderzoeksgroep. [REDACTED] Zij vonden een afname in TTP (maat voor de doorbloeding van de nieren) in ratten [REDACTED] controle $7,5 \pm 5,0$ s vs [REDACTED] $18,5 \pm 8,8$ s.

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (18,5 - 7,5) = 11$

variantie $\sigma = 6,9$

$(n/2)^{1/2} = 2,03 \rightarrow n=9$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 9 muizen per groep. Met een uitval van 10% door te [REDACTED] en 10% uitval bij analyses gebaseerd op de ervaringen in ratten zijn 10 muizen per groep noodzakelijk.

Twee-foton microscopie

Er zijn nog geen analyses gedaan met betrekking tot het lekken van de haarvaten in de nier [REDACTED] [REDACTED] Daarom is de poweranalyse gebaseerd op een artikel van een andere onderzoeksgroep (Sharfuddin A, J Am Soc Nephrol 2009; 20: 524-534). Zij vonden een afname van het lekken van de haarvaten in ischemische nieren na behandeling in vergelijking met onbehandelde ischemische nieren: controle $5,25 \pm 4,50$ vs [REDACTED] $0,50 \pm 0,62$

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (5,25 - 0,50) = 4,75$

variantie $\sigma = 2,56$

$(n/2)^{1/2} = 1,75 \rightarrow n = 7$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 7 muizen per groep. Met een uitval van 10% door te [REDACTED] gebaseerd op de ervaringen in ratten en een uitval van 10% op basis van de analyses zijn 8 muizen per groep noodzakelijk.

Onderzoeksvraag 3

A: zie onderzoeksvraag 2

B: De poweranalyse is gebaseerd op artikel van een andere onderzoeksgroep. [REDACTED] Zij vonden een toename in het circulerend creatinine (markers voor nierschade) in ratten [REDACTED] [REDACTED]: controle 27 ± 4 vs [REDACTED] 42 ± 14 $\mu\text{mol/L}$

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (42 - 27) = 14$

variantie $\sigma = 9$

$(n/2)^{1/2} = 2,08 \rightarrow n=9$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 9 muizen per groep. Met een uitval van 20% door te [REDACTED] en de overleving na het bij komen uit de narcose en een uitval van 10% bij de moleculaire analyses gebaseerd op de ervaringen in ratten zijn 12 muizen per groep noodzakelijk.

B. De dieren

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

Gekozen is om de onderzoeksvragen te beantwoorden in jong volwassen, mannelijke C57Bl6 muizen afkomstig van een erkende leverancier. De transgene muizen zullen afkomstig zijn van een erkende leverancier of eigen fok. Er wordt geen ongerief verwacht bij de fokdieren. Er zullen maximaal 1878 muizen gebruikt worden (zie tabel 1).

Er is gekozen voor muizen van het mannelijke geslacht, omdat het meten van de doorbloeding in de haarvaten wordt gedaan met behulp van intravitaal microscopie [REDACTED]

Een voordeel van muizen ten opzichte van ratten is dat de stap om bepaalde moleculaire systemen te moduleren makkelijker is in muizen. Tijdens dit onderzoek zullen wij genetische modellen benutten tijdens

stap 2 voor het bestuderen van de rol van bepaalde eiwitten/genen in het ontstaan van doorbloedingsstoornissen en orgaan falen [REDACTED].

Tabel 1: Overzicht van de benodigde muizen

	Techniek	Doel	Aantal groepen ¹	Muizen per groep ²	Aantal interventies ³	Terminatie momenten ⁴	Totaal aantal muizen ⁵
1	Moleculaire analyses + intravitaal microscopie	Moleculaire veranderingen	2	9	0	2	36
2	Intravitaal microscopie + moleculaire analyses	Doorbloeding & moleculaire veranderingen	2	23	6	2	552
	Extravasatie EB	Vaatlekkage	4 (incl controle groepen vraag 1)	18	6	1	432
	Contrast echo	Doorbloeding	4 (incl controle groepen vraag 1)	10	6	1	240
	Twee-foton microscopie	Doorbloeding & vaatlekkage	4 (incl controle groepen vraag 1)	8	6	1	192
3A	Intravitaal microscopie + moleculaire analyses	Doorbloeding & moleculaire veranderingen	2	23	3	1	138
	Extravasatie EB	Vaatlekkage	2	18	3	1	108
	Contrast echo	Doorbloeding	2	10	3	1	60
	Twee-foton microscopie	Doorbloeding & vaatlekkage	2	8	3	1	48
3B	Moleculaire analyses	Schade markers & moleculaire veranderingen	2	12	3	1	72
						Totaal:	1878

¹ Aantal groepen op basis van figuur 2

² Muizen per groep gebaseerd op de poweranalyse

³ Modulaties van moleculaire systemen. Het aantal interventies is geschat op 6 en 3 op basis van ervaring, literatuur, tijd en capaciteit van de onderzoeksgroep.

⁴ Momenten waarop muizen getermineerd worden: [REDACTED] (figuur 2)

⁵ Totaal aantal muizen: 1*2*3*4

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 bestuderen van het lekken en de doorbloeding van de haarvaten [REDACTED] in mensen is zeer complex. Vanaf de binnenkomst van een dergelijke patiënt in het ziekenhuis vinden er acute

interventies en transportmomenten plaats die maken dat de metingen praktisch onuitvoerbaar zijn. Daarnaast zal in de kliniek onmiddellijk worden overgegaan op het geven van [REDACTED] en er geen gecontroleerde situatie ontstaat waarin wij kunnen meten. Tot slot is de toediening van de meeste interventies in patiënten nog zeer experimenteel, en zijn meer dierstudies nodig om de effecten op de doorbloeding van deze middelen te kunnen bestuderen. Daarom zijn dierproeven essentieel voor dit onderzoek en kunnen niet worden vervangen. Vervanging van de dierproeven door middel van celkweken is naar onze mening niet mogelijk, omdat er geen celkweek modellen bestaan die de complexe interactie van de bloedstroom, de binnenbekleding van de haarvaten en orgaanschade nabootsen. Om die reden is er naar ons weten geen alternatief voor de hier voorgestelde dierproeven.

Vermindering

Binnen de studie hebben wij voor technieken gekozen die in één dier op verschillende tijdstippen kunnen meten. Hierdoor kunnen wij de effecten [REDACTED] bepalen en vervolgens de effecten van de standaard klinische behandeling, zodat er geen extra groep muizen nodig is. Daarnaast is het mogelijk om verschillende technieken in één dier te combineren, wat leidt tot vermindering van het aantal muizen. Door bijvoorbeeld na terminatie de organen uit de muizen die gebruikt worden voor intravitaal microscopie te isoleren, is het niet nodig hier extra dieren voor te includeren. Ten slotte zijn het aantal muizen per groep door een poweranalyse tot een minimum beperkt.

Verfijning

Wij hebben getracht het ongerief zo laag mogelijk te houden door alle handelingen onder adequate narcose en pijnstilling te laten plaatsvinden, en de experimenten dusdanig te ontwerpen dat het dier tijdens de narcose wordt getermineerd (1, 2 en 3A). Bij de laatste stap (onderzoeksvraag 3B) zullen wij de muizen bij laten komen uit de narcose, maar deze muizen zullen adequate pijnstilling krijgen om het ongerief zo gering mogelijk te houden. De laatste stap voeren wij uit om de vergelijking met de humane situatie zo groot mogelijk te maken aangezien patiënten [REDACTED] pas na enkele dagen orgaanschade zullen ontwikkelen.

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.

Alle handelingen vinden plaats onder adequate narcose en pijnstilling. Bij onderzoeksvragen 1, 2 en 3A zullen de muizen niet bijkomen uit de narcose. Bij onderzoeksvraag 3B zullen de muizen wel bijkomen uit de narcose, maar zal adequate pijnstilling worden toegediend in de postoperatieve periode om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden.

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.

Voorheen hebben wij laten zien dat [REDACTED] in ratten leidt tot verstoringen in de doorbloeding van de haarvaten [REDACTED] en dat het [REDACTED] systeem hierbij betrokken is. Deze resultaten vormen de basis van deze vervolg aanvraag. Wij hebben financiering ontvangen om onze eerder bevonden resultaten te bestuderen in verschillende klinisch relevante organen en de lange termijn effecten van het moduleren van het [REDACTED] systeem. Dit onderzoek is nog niet eerder uitgevoerd in deze en andere patienten populaties.

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?

X Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

X 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.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

nvt

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

Alle handelingen vinden plaats onder adequate narcose en perioperatieve pijnstilling. Voor de operaties wordt er plaatselijk verdoving gegeven. Zodra er een arterie lijn aanwezig is wordt er aanvullend elke 20 minuten pijnstilling toegediend. Vervolgens worden de muizen de gehele procedure gemonitord. Op basis van veranderingen in hartslag en bloeddruk worden zowel de narcose als pijnstilling aangepast. Ruime expertise is aanwezig om de veranderingen in hartslag en bloeddruk adequaat te interpreteren. De muizen uit onderzoeksvragen 1, 2 en 3A worden onder narcose en pijnstilling getermineerd. Op het moment dat de muizen bijkomen uit de narcose (onderzoeksvraag 3B) wordt in de postoperatieve periode adequate pijnstilling toegediend om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Alle handelingen vinden plaats onder algehele narcose en met adequate pijnbestrijding. Eén procent van de muizen kunnen ongerief ondervinden door het ontwikkelen van acuut nier- of long falen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Vier procent van de muizen zullen bijkomen uit de algehele narcose, hiervan zal minder dan 1/3 schade aan de longen of nieren ontwikkelen ten gevolge van [REDACTED].

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

Humane eindpunten zullen worden gehanteerd.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Alleen bij onderzoeksvraag 3B zullen wij humane eindpunten hanteren omdat de muizen zullen bijkomen uit de narcose. Ondanks dat de muizen behandeld worden volgens de standaard klinische procedure en adequate pijnstilling in de postoperatieve periode zullen krijgen is het mogelijk dat de muizen een ongunstige prognose hebben. Wij hanteren als humane eindpunten de volgende criteria: een gewichtsverlies van 15%, verminderde activiteit, gebogen rug en een onverzorgde vacht.

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

Wij verwachten dat de kans zeer klein is (<5%). Eerder onderzoek van een onderzoeksgroep waar wij nauw mee samenwerken hebben een 100% overleving laten zien van muizen die bijkwamen uit de narcose

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.

Voor onderzoeksvragen 1, 2 en 3A wordt het ongerief geschat op terminaal (zie tabel 2). Het betreft een experiment dat gevolgd wordt door terminatie waarbij alle handelingen plaats vinden onder narcose en adequate pijnstilling. Het ongerief voor de muizen bestaat uit het éénmalige ondergrondse transport van het proefdiercentrum naar het onderzoeksgebouw en het onder narcose brengen van de muizen.

Voor onderzoeksvraag 3B wordt het ongerief geschat op matig (zie tabel 2). Deze muizen zullen niet getransporteerd worden naar een andere faculteit. De muizen worden onder narcose gebracht en alle handelingen zullen plaatsvinden onder algehele narcose en adequate pijnstilling. Vervolgens zullen de muizen bijkomen uit de narcose en worden voor 7 dagen gevolgt onder postoperatieve pijnstilling waar nodig. Voor terminatie worden de muizen nogmaals onder narcose gebracht.

Tabel 2: Ongerief classificatie

(% = percentage muizen die handeling ondergaan / n = aantal muizen die handeling ondergaan)

Soort ongerief	Stap 1		Stap 2		Stap 3A		Stap 3B	
	%	n	%	n	%	n	%	n
Transport van huisvesting naar lab	100	36	100	1416	100	354		
Inductie narcose	100	36	100	1416	100	354	100	72
Bijkomen narcose							100	72
Pijnstilling i.p.							100	72
Opnieuw narcose voor terminatie							100	72
Cumulatief ongerief	Terminaal		Terminaal		Terminaal		Matig	

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De organen en het bloed worden gebruikt voor moleculaire analyses.

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.

x Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- 1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- 2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- 3. Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- 4. 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.	VU medisch centrum Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	

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.

Diermodel	1. Extracorporale circulatie
Moleculaire systemen	1. Angiopoietine/Tie2/Tie1 systeem 2. Proteïne C/thrombine systeem 3. Sphingosine systeem 4. Overige systemen
Lekken van haarvaten	1. Extravasatie van blauwe kleurstof 2. Twee-foton microscopie nier
Vloeistof stapeling	1. Millar catheter
Doorbloeding haarvaten	1. Intravitaal microscopie cremaster 2. Contrast echografie nier en hart 3. Twee-foton microscopie nier
Orgaan falen	1. Hyperspectraal imaging 2. Markers in bloed 3. Histologie 4. RNA/eiwit analyses

techniek ook gebruikt in patiënten wat de translatie van het meten van de doorbloeding van de haarvaten met deze specifieke techniek naar de patiënten vergroot.

3. *Twee-foton microscopie*

De doorbloeding van de haarvaten in de nier wordt bestudeerd met twee-foton microscopie door het toedienen van fluorescente markers (zie ook 'lekkende van de haarvaten'). Een voordeel van deze techniek is dat onderscheidt gemaakt kan worden in de grootte van de vaten en tegelijkertijd het lekken van de haarvaten in beeld gebracht kan worden. Daarbij kan gebruik gemaakt worden van verschillende molecuulgroottes van de fluorescente markers om meer inzicht te krijgen in de mate van lekkage.

Orgaan falen

Als gevolg van een verstoorde doorbloeding zullen de omliggende weefsels minder of geen zuurstof krijgen (hypoxie) wat uiteindelijk leidt tot het falen van de organen.

1. *Hyperspectraal imaging*

De hyperspectraal camera maakt het mogelijk om oxyhemoglobine en deoxyhemoglobine te meten en de hoeveelheid zuurstof in de weefsels te bepalen in ratten onder narcose. Het voordeel van deze techniek is dat deze ook in de klinische setting gebruikt kan worden.

2. *Markers in bloed*

Tijdens de experimenten wordt er op meerdere tijdstippen bloed afgenomen om eiwitten die een rol spelen bij het falen van de organen te bestuderen in het plasma (bv. met behulp van ELISA's).

3. *Histologie*

Aan het einde van de experimenten worden verschillende organen ingevroren voor verdere moleculaire analyses. Door middel van (immuno)histologie wordt gekeken naar schade in de organen.

4. *RNA/eiwit analyses*

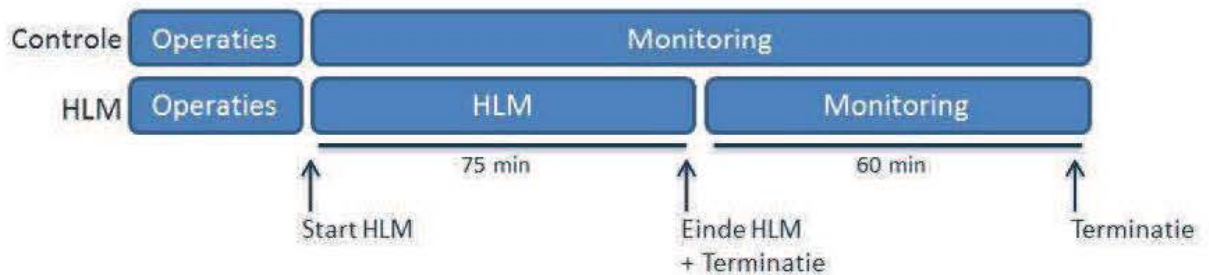
Eiwit en gen expressie profielen worden gemeten met behulp van western blotten en PCR, respectievelijk.

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.

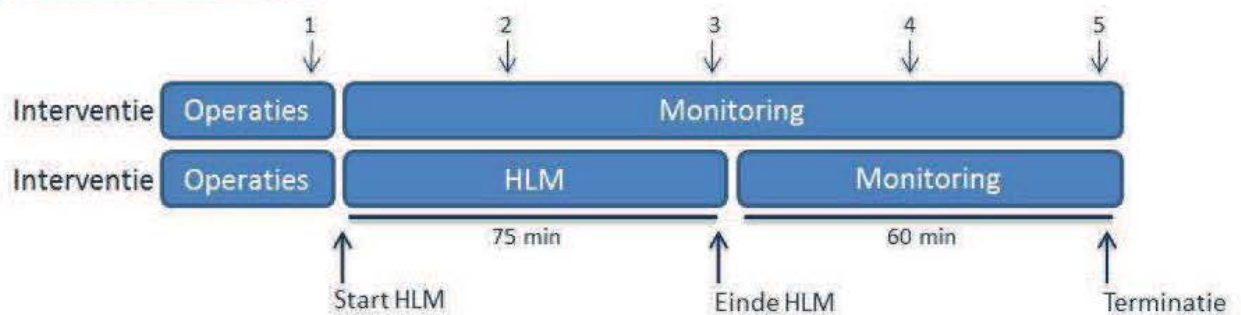
Een schematisch overzicht van de experimenten is weergegeven in figuur 2. De experimenten bestaan uit 2 groepen; een controle groep en een groep waarbij de ratten

De HLM groep bestaat uit ratten die voor 75 minuten. Na worden de ratten nog 1 uur vervolgd onder narcose bij onderzoeksvraag 1 en 2, voor 6 uur onder narcose bij onderzoeksvraag 3A of voor 7 dagen na bijkomen uit de narcose bij onderzoeksvraag 3B (zie figuur 2).

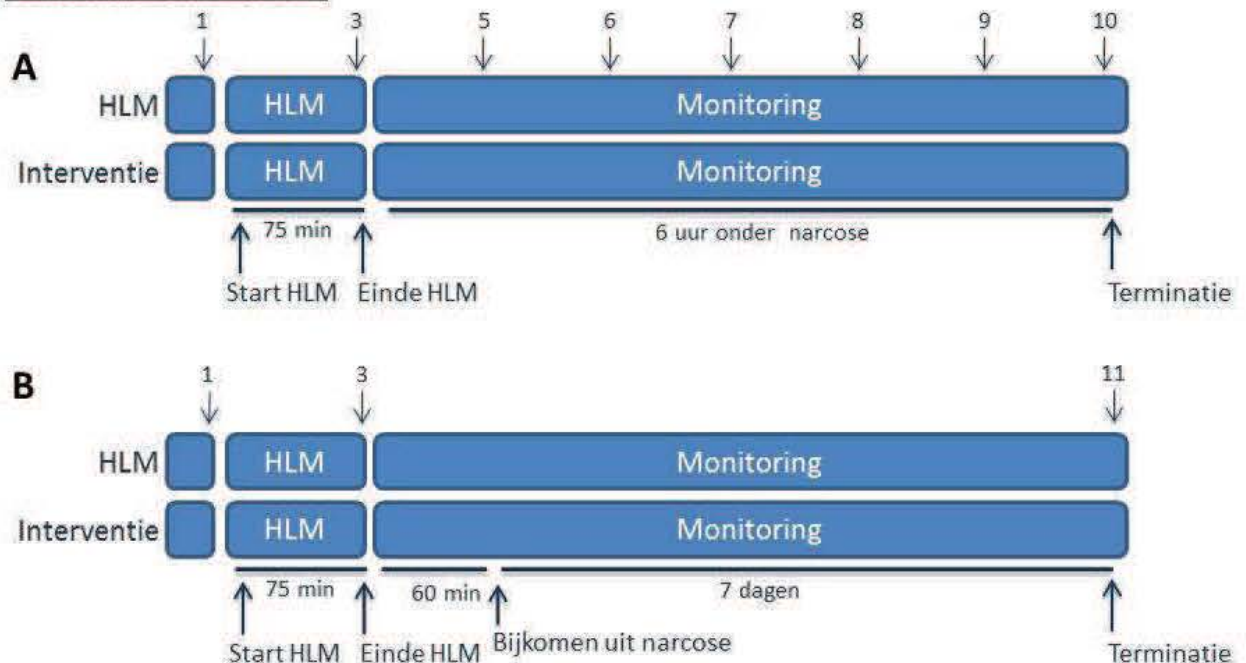
Onderzoeksvraag 1



Onderzoeksvraag 2



Onderzoeksvraag 3



Terminatie:

Bij onderzoeksvraag 1 worden de ratten op 2 momenten getermineerd: Direct [redacted] en 1 uur [redacted]. Bij onderzoeksvraag 2 en 3 worden de ratten aan het einde van het experiment getermineerd.

Metingen:

De metingen worden verricht op de momenten 1 t/m 11 zoals vermeld in figuur 2. Tijdstmomenten 1 t/m 5: metingen elk half uur en tijdstmomenten 5 t/m 10: metingen elk uur (onderzoeksvraag 3A). Bij onderzoeksvraag 3B zal alleen een meting verricht worden op tijdstpunten 1, 3 en 11 (na 7 dagen) in verband met het onder narcose brengen van de ratten. Het gaat hierbij om alle metingen met betrekking tot het lekken van de haarvaten, het stapelen van vloeistof en de doorbloeding van de haarvaten, behalve de extravasatie van de blauw kleurstof omdat dit terminale experimenten betreffen.

Op dezelfde tijdstmomenten zal ook bloed worden afgenomen om circulerende markers te analyseren.

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

De eindpunten van bovenbeschreven onderzoeksvragen zijn:

- 1: moleculaire veranderingen betrokken bij het lekken van de haarvaten
- 2: doorbloeding van de haarvaten
- 3: markers voor orgaan falen

De data verkregen uit de genoemde experimenten zijn numeriek van karakter en zullen worden geanalyseerd met behulp van een student's t-test, one-way of two-way ANOVA met repeated measurements en Bonferroni als post-hoc analyse. De keuze van de statistische analyse hangt af van de te testen parameter en studie opzet.

Onderzoeksvraag 1

De poweranalyse is gebaseerd op een eerder uitgevoerde studie in ratten [REDACTED], waarbij een verlaging van [REDACTED] gen expressie in de nier is gevonden:

Nier: controle $0,00085 \pm 0,00060$ a.u. vs. [REDACTED] $0,00013 \pm 0,00007$ a.u.

$$(n/2)^{1/2} = z_{\alpha/2} - z_{\kappa} / ((\mu_1 - \mu_2) / \sigma)$$

Waarbij

$$z_{\alpha/2} - z_{\kappa} = 3,242 \quad (\alpha = 0,05, p = 0,90)$$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (0,00085 - 0,00013) = 0,00072$$

$$\text{variantie } \sigma = 0,000335$$

$$(n/2)^{1/2} = 1,51 \rightarrow 5$$

Met een alfa van 0.05 en beta van 0.9 komen wij dan uit op 5 ratten per groep. Met een uitval van 30% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] zijn 7 ratten per groep noodzakelijk.

Onderzoeksvraag 2

De poweranalyse is gebaseerd op een eerder uitgevoerde studie in ratten [REDACTED]. De poweranalyse is gebaseerd op de uitkomsten van 4 verschillende technieken omdat deze technieken niet in 1 dier uit te voeren zijn.

Intravitaal microscopie

Toename van het aantal doorbloedde haarvaten [REDACTED] van ratten [REDACTED] met een behandeling gericht op het stimuleren van [REDACTED] $4,85 \pm 1,89$ vs [REDACTED] met behandeling $7,70 \pm 3,19$

$$\text{effectmaat } \mu_1 - \mu_2 = (7,70 - 4,85) = 2,85$$

$$\text{variantie } \sigma = 2,54$$

$$(n/2)^{1/2} = 2,89 \rightarrow n = 17$$

Met een alfa van 0.05 en beta van 0.9 komen wij dan uit op 17 ratten per groep. Met een uitval van 30% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] zijn 22 ratten per groep noodzakelijk.

→ De moleculaire analyses worden ook in deze groepen ratten uitgevoerd, zodat hiervoor geen extra ratten nodig zijn.

Extravasatie van blauwe kleurstof

Afname van extravasatie van de blauwe kleurstof in de longen van ratten [REDACTED] met een behandeling gericht op het stimuleren van [REDACTED] $29,40 \pm 15,78$ vs. [REDACTED] met behandeling $19,05 \pm 6,82$

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (29,40 - 19,05) = 10,35$

variantie $\sigma = 11,3$

$(n/2)^{1/2} = 3,54 \rightarrow n = 25$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 25 ratten per groep. Met een uitval van 30% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] zijn 33 ratten per groep noodzakelijk.

Contrast echografie

Het meten van de doorbloeding met contrast echografie [REDACTED] is nog niet eerder gepubliceerd. Daarom is de poweranalyse is gebaseerd op artikel van een andere onderzoeksgroep. (Lin Q, J Med Ultrason 2015; 42(2):199-205) Zij vonden een afname in TTP (maat voor de doorbloeding van de nieren) in ratten [REDACTED]: controle $7,5 \pm 5,0$ vs [REDACTED] $18,5 \pm 8,8$ sec.

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (18,5 - 7,5) = 11$

variantie $\sigma = 6,9$

$(n/2)^{1/2} = 2,03 \rightarrow n = 9$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 9 ratten per groep. Met een uitval van 30% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] zijn 12 ratten per groep noodzakelijk.

Twee-foton microscopie

Er zijn nog geen analyses gedaan met betrekking tot het lekken van de haarvaten in de nier [REDACTED]. Daarom is de poweranalyse gebaseerd op een artikel van een andere onderzoeksgroep. (Sharfudding A, J Am Soc Nephrol 2009; 20: 524-534) Zij vonden een afname van het lekken van de haarvaten in ischemische nieren van ratten na behandeling in vergelijking met onbehandelde ischemische nieren: controle $5,25 \pm 4,50$ vs [REDACTED] $0,50 \pm 0,62$

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (5,25 - 0,50) = 4,75$

variantie $\sigma = 2,56$

$(n/2)^{1/2} = 1,75 \rightarrow n = 7$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 7 ratten per groep. Met een uitval van 30% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] zijn 10 ratten per groep noodzakelijk.

Onderzoeksvraag 3

A: zie onderzoeksvraag 2

B: De poweranalyse is gebaseerd op artikel van een andere onderzoeksgroep. [REDACTED] Zij vonden een toename in het circulerend creatinine (markers voor nierschade) in ratten [REDACTED]: controle $19,33 \pm 3,77$ vs. [REDACTED] $64,50 \pm 33,14$

effectmaat $\mu_1 - \mu_2 = (64,50 - 19,33) = 45,17$

variantie $\sigma = 18,46$

$(n/2)^{1/2} = 1,32 \rightarrow n = 4$

Met een alfa van 0.05 en bèta van 0.9 komen wij dan uit op 4 ratten per groep. Met een uitval van 40% gebaseerd op eerdere ervaringen [REDACTED] en de overleving na het bij komen uit de narcose zijn 6 ratten per groep noodzakelijk.

B. De dieren

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

Gekozen is om de onderzoeksvragen te beantwoorden in mannelijke Wistar ratten afkomstig van een erkende leverancier. De ratten zullen een gewicht hebben tussen de 375 en 425 gram in verband met hun circulerend volume. [REDACTED]

Dit is tevens de reden dat het onderzoek uitgevoerd wordt in ratten. Op het moment bestaat er geen [REDACTED] waardoor wij genooddaakt zijn om het onderzoek in ratten uit te voeren.

Er is gekozen voor ratten van het mannelijke geslacht, omdat het meten van de doorbloeding in de haarvaten wordt gedaan met behulp van intravitaal microscopie [REDACTED]

Daarnaast is in de literatuur niets bekend is over mogelijke verschillen tussen beide geslachten na

Tabel 1: Overzicht van de benodigde ratten

	Techniek	Doel	Aantal groepen ¹	Ratten per groep ²	Aantal interventies ³	Terminatie momenten ⁴	Totaal aantal ratten ⁵
1	Moleculaire analyses + intravitaal microscopie	Moleculaire veranderingen	2	7	0	2	28
2	Intravitaal microscopie + moleculaire analyses	Doorbloeding & moleculaire veranderingen	2	22	6	2	528
	Extravasatie EB	Vaatlekkage	4 (incl controle groepen vraag 1)	33	6	1	792
	Contrast echo	Doorbloeding	4 (incl controle groepen vraag 1)	12	6	1	288
	Twee-foton microscopie	Doorbloeding & vaatlekkage	4 (incl controle groepen vraag 1)	10	6	1	240
3A	Intravitaal microscopie + moleculaire analyses	Doorbloeding & moleculaire veranderingen	2	22	3	1	132
	Extravasatie EB	Vaatlekkage	2	33	3	1	198
	Contrast echo	Doorbloeding	2	12	3	1	72
	Twee-foton microscopie	Doorbloeding & vaatlekkage	2	10	3	1	60
3B	Moleculaire analyses	Schade markers & moleculaire veranderingen	2	6	3	1	36
						Totaal:	2374

¹ Aantal groepen op basis van figuur 2

² Ratten per groep gebaseerd op de poweranalyse

³ Modulaties binnen moleculaire systemen. Het aantal interventies is geschat op 6 en 3 op basis van ervaring, literatuur, tijd en capaciteit van de onderzoeksgroep.

⁴ Terminatie momenten: direct en 1 uur (figuur 2)

⁵ Totaal aantal ratten: 1*2*3*4

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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging

Het bestuderen van het lekken en de doorbloeding van de haarvaten

in mensen is zeer complex. De daadwerkelijk belangrijke vaatbedden, zoals in de nieren en longen, zijn dikwijls niet toegankelijk. Daarom zijn dierproeven essentieel voor dit onderzoek en kunnen niet worden vervangen. Daarnaast is de toediening van de meeste interventies in patiënten nog zeer experimenteel, en zijn meer dierstudies nodig om de effecten op de doorbloeding van deze middelen te kunnen bestuderen. Vervanging van de dierproeven door middel van celkweek is naar onze mening niet mogelijk, omdat er geen celkweek modellen bestaan die de complexe interactie van de bloedstroom, de binnenbekleding van de haarvaten en orgaanschade nabootsen. Om die reden is er naar ons weten geen alternatief voor de hier voorgestelde dierproeven.

Vermindering

Binnen de studie hebben wij voor technieken gekozen die in één dier op verschillende tijdstippen kunnen meten. Hierdoor kunnen wij de effecten bepalen en vervolgens de effecten op lange termijn, zodat er geen extra groep ratten nodig is. Daarnaast is het mogelijk om een meerdere technieken in één dier te combineren, wat leidt tot vermindering van het aantal ratten. Door bijvoorbeeld na terminatie de organen uit de ratten die gebruikt worden voor intravitaal microscopie te isoleren, is het niet nodig hier extra dieren voor te includeren. Ten slotte zijn het aantal ratten per groep door een poweranalyse tot een minimum beperkt.

Verfijning

Wij hebben getracht het ongerief zo laag mogelijk te houden door alle handelingen onder adequate narcose en pijnstilling te laten plaatsvinden, en de experimenten dusdanig te ontwerpen dat het dier tijdens de narcose wordt getermineerd (1, 2 en 3A). Bij de laatste stap (3B) zullen wij de ratten bij laten komen uit de narcose, maar deze ratten zullen adequate pijnstilling krijgen om het ongerief zo gering mogelijk te houden. De laatste stap voeren wij uit om de vergelijking met de humane situatie zo groot mogelijk te maken aangezien patiënten pas na enkele dagen orgaan schade zullen ontwikkelen.

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.

Alle handelingen vinden plaats onder adequate narcose en pijnstilling. Bij onderzoeksvragen 1, 2 en 3A zullen de ratten niet bijkomen uit de narcose. Bij onderzoeksvraag 3B zullen de ratten wel bijkomen uit de narcose, maar zal adequate pijnstilling worden toegediend in de postoperatieve periode om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden.

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.

Voorheen hebben wij laten zien dat leidt tot verstoringen in de doorbloeding van de haarvaten en dat het systeem hierbij betrokken is. Deze resultaten vormen de basis van deze vervolg aanvraag. Wij hebben financiering ontvangen om onze eerder bevonden resultaten te bestuderen in verschillende klinisch relevante organen en de lange termijn effecten van het moduleren van het systeem. Dit onderzoek is nog niet eerder uitgevoerd in deze en andere patienten populaties.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

X 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.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

nvt

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

Alle handelingen vinden plaats onder adequate narcose en perioperatieve pijnstilling. Voor de operaties wordt er plaatselijk verdoving gegeven. Zodra er een arterie lijn aanwezig is wordt er aanvullend elke 20 minuten pijnstilling toegediend. Vervolgens worden de ratten de gehele procedure gemonitord. Op basis van veranderingen in hartslag en bloeddruk worden zowel de narcose als pijnstilling aangepast. Ruime expertise is aanwezig om de veranderingen in hartslag en bloeddruk adequaat te interpreteren. De ratten uit onderzoeksvragen 1, 2 en 3A worden onder narcose en pijnstilling getermineerd. Op het moment dat de ratten bijkomen uit de narcose (onderzoeksvraag 3B) wordt in de postoperatieve periode adequate pijnstilling toegediend om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Alle handelingen vinden plaats onder algehele narcose en met adequate pijnbestrijding. Eén procent van de ratten kunnen ongerief ondervinden door het ontwikkelen van acuut nier- of long falen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1,5% procent van de ratten zullen bijkomen uit de algehele narcose, hiervan zal minder dan 1/3 schade aan de longen of nieren ontwikkelen ten gevolge van ██████████.

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

Humane eindpunten zullen worden gehanteerd.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Alleen bij onderzoeksvraag 3B zullen wij humane eindpunten hanteren omdat de ratten zullen bijkomen uit de narcose. Ondanks dat de ratten behandeld worden volgens de standaard klinische procedure en adequate pijnstilling in de postoperatieve periode zullen krijgen is het mogelijk dat de ratten een ongunstige prognose hebben. Wij hanteren als humane eindpunten de volgende criteria: een gewichtsverlies van 15%, verminderde activiteit, gebogen rug en een onverzorgde vacht.

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

Er is laten zien dat 100% van de ratten overleven voor 2 uur na [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED] Wij willen de ratten voor 7 dagen vervolgen en hebben daarom de uitval op 10% geschat.

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.

Voor onderzoeksvragen 1, 2 en 3A wordt het ongerief geschat op terminaal (zie tabel 2). Het betreft een experiment dat gevolgd wordt door terminatie waarbij alle handelingen plaats vinden onder narcose en adequate pijnstilling. Het ongerief voor de ratten bestaat uit het éénmalige ondergrondse transport van het proefdiercentrum naar het onderzoeksgebouw en het onder narcose brengen van de ratten.

Voor onderzoeksvraag 3B wordt het ongerief geschat op matig (zie tabel 2). Deze ratten zullen niet getransporteerd worden naar een andere faculteit. De ratten worden onder narcose gebracht en alle handelingen zullen plaatsvinden onder algehele narcose en adequate pijnstilling. Vervolgens zullen de ratten bijkomen uit de narcose en worden voor 7 dagen vervolgt onder postoperatieve pijnstilling waar nodig. Voor terminatie worden de ratten nogmaals onder narcose gebracht.

Tabel 2: Ongerief classificatie

(1, 2, 3A, 3B: onderzoeksvragen / % = percentage ratten die handeling ondergaan

Soort ongerief	Stap 1		Stap 2		Stap 3A		Stap 3B	
	%	n	%	n	%	n	%	n
Transport van huisvesting naar lab	100	28	100	1848	100	462		
Inductie narcose	100	28	100	1848	100	462	100	36
Bijkomen narcose							100	36
Pijnstilling i.p.							100	36
Opnieuw narcose voor terminatie							100	36
Cumulatief ongerief	Terminaal		Terminaal		Terminaal		Matig	

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De organen en het bloed worden gebruikt voor moleculaire analyses.

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.

x Ja

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

Het NVWA nummer is 11400

2. Titel van het project:

Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten

3. Titel van de NTS:

Herstel van lekkende haarvaten om de doorbloeding van organen te verbeteren en orgaanschade te voorkomen

4. Type aanvraag:

Nieuwe aanvraag projectvergunning

5. Contactgegevens DEC:

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

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

- ☐ ontvangen door DEC: *30-03-2017*
- ☐ aanvraag compleet: *30-03-2017*
- ☐ in vergadering besproken: *11-04-2017*
- ☐ anderszins behandeld: *n.v.t.*
- ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: *12-04-2017 tot 03-05-2017 en 19-05-2017 tot 24-05-2017*
- ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
- ☐ aanpassing aanvraag: *24-05-2017*
- ☐ advies aan CCD: *12-06-2017*

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

-Datum advies IvD: *30-03-2017*

-Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*

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

9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *12-04-2017*

- Strekking gestelde vragen: *1. Bij NTS en voorstel onderdeel 3.1 om hoeveel patiënten gaat het hier? Graag meer informatie over de huidige stand van zaken, wat is precies de translationele waarde van dit onderzoek? 2. Veel spelling en taalfouten 3. Bij voorstel 3.4.1 Kan er niet meer in vivo (vervanging) gedaan worden? Kan men experiment 1 niet in celkweek doen? Waarom niet? 4. Graag*

een onderbouwing toevoegen bij de keuze voor de modellen. 5. Bij 3.4.2. en 3.4.3 de dieren zullen bijkomen na de narcose, dit is niet duidelijk weergegeven, graag toevoegen. 6. Bij de bijlagen dierproeven graag de titel veranderen, het gaat het om de techniek. 7. De beoogde behandelingen in de bijlagen moeten duidelijker worden weergegeven, waarop is het aantal interventies gebaseerd? 8. Bij D, vermindering moet men beter onderbouwen.

- Datum antwoord: 03-05-2017

- Strekking van de antwoord(en): 1. acuut falen van de nier (1 op de 7 patiënten) en acuut falen van de long (1 op de 6 patiënten) 2. Gedaan 3. De huidige behandeling van deze patiënten is gericht op de macrocirculatie, zoals het herstellen van de bloeddruk en de hartslag. Maar juist verstoringen in de microcirculatie (haarvaten) zijn een belangrijke voorspellende factor voor het ontwikkelen van orgaanfalen in ernstig zieke patiënten. Helaas bereikt de huidige therapie van deze patiënten nog niet de haarvaten. Door de complexe interactie van systemen is dit niet mogelijk met celkweek te bestuderen. 4. Ernstig zieke patiënten zijn patiënten [REDACTED]

[REDACTED] Wij hebben gekozen om de eerste twee patiëntpopulaties te bestuderen. De derde patiëntpopulatie, [REDACTED] wordt uitgebreid bestudeerd door een andere onderzoeksgroep waar wij intensief mee samenwerken. 5. Aangevuld in het projectvoorstel. 6. Gedaan 7. Het aantal interventies is geschat op 6 en 3 op basis van ervaring, literatuur, tijd en capaciteit van de onderzoeksgroep. De interventies zullen gekozen worden op basis van de uitkomsten in onderzoeksvraag 1 en kunnen 1, maar ook meerdere subsystemen betreffen. 8. Daarnaast is het mogelijk om verschillende technieken in één dier te combineren, wat leidt tot vermindering van het aantal muizen. Door bijvoorbeeld na terminatie de organen uit de muizen die gebruikt worden voor intravitaal microscopie te isoleren, is het niet nodig hier extra dieren voor te includeren.

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

Vraagronde 2

- Datum: 19-05-2017

- Strekking gestelde vragen: 1. Is het nog mogelijk om iets te zeggen over het aantal ernstig ziek patiënten dat jaarlijks in NL ziekenhuizen baat zou kunnen hebben bij deze behandeling? 2. Verder zou de DEC nog graag willen weten op welke patiënten er nu medicatie (waarvan de werking in eerder onderzoek is aangetoond) wordt getest om de microcirculatie te bevorderen. 3. Graag in de bijlagen de aantallen narekenen en bij onderdeel I toevoegen dat er kans is op orgaanfalen.

- Datum antwoord: 24-05-2017

- Strekking van de antwoord(en): 1. In Nederland ontwikkelen jaarlijks 2150 patiënten nierfalen en 2500 patiënten longfalen [REDACTED]. Het is niet bekend hoeveel patiënten [REDACTED] per jaar in Nederland. Wel is bekend dat deze patiënten een kans hebben van 1 op 7 en 1 op 6 op het ontwikkelen van nier- en longfalen, respectievelijk. 2. Wij zijn bezig met het opstarten van een klinische studie om de effecten van [REDACTED] op de doorbloeding van de haarvaten in patiënten [REDACTED] te bestuderen. Helaas zijn er ook negatieve effecten van [REDACTED] bekend en vervolg onderzoek blijft daarom nodig. De [REDACTED] medicatie zit nu in een fase 1 trial en de toekomst zal uitwijzen of dit nieuwe medicijn daadwerkelijk door kan stromen naar een fase 2 trial en verder. 3. De aantallen en onderdeel I zijn aangepast. Eén procent van de dieren kan ongerief ondervinden door het ontwikkelen van acuut nier- of long falen.

10. 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. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom: *n.v.t., geen van de DEC leden is betrokken bij dit project.*

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).: *n.v.t.*
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

Een slechte doorbloeding van de haarvaten is kenmerkend bij ernstig zieke patiënten. Dit zijn bijvoorbeeld patiënten [REDACTED]. Een slechte doorbloeding van de haarvaten in deze patiënten kan leiden tot schade aan de nieren en/of de longen. De hypothese is dat de doorbloeding verslechtert doordat de haarvaten gaan lekken. Gezonde bloedvaten hebben een speciale "binnenbekleding" die de vaten waterdicht houden. Beschadigde haarvaten kunnen gaan lekken doordat de binnenbekleding van de vaatjes te poreus wordt door bv. [REDACTED]. Er bestaat momenteel geen effectieve behandeling gericht op het voorkomen of herstellen van de schade aan de haarvaten.

Het directe doel van deze studie is het ontrafelen van de moleculaire systemen die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten. Wanneer er in kaart is gebracht welke eiwitten belangrijk zijn kan men de activiteit van deze eiwitten stimuleren of remmen om te onderzoeken of hiermee de doorbloeding herstelt, wat het effect is op langere termijn en of het orgaanfalen vermindert. Het

uiteindelijke doel van de studie is om nieuwe medicijnen te ontwikkelen die ervoor zorgen dat de haarvaten minder lekken en die de doorbloeding van de haarvaten verbetert om zo de kans op orgaanfalen te verminderen. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de (ernstig zieke) patiënten. De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De fundamentele kennis zal bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe medicijnen om het lekken van haarvaten, [REDACTED] bij ernstig zieke patiënten, te verminderen.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: *n.v.t*

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

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. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder, en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van medicijnen om het lekken van haarvaten en de kans op orgaanfalen te verminderen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opbouw en de financiële ondersteuning.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Alle handelingen bij de acute experimenten vinden plaats onder adequate narcose en pijnstilling, het ongerief is hierbij terminaal. Bij de lange termijn experimenten vinden de handelingen plaats onder narcose, maar zullen we dieren bijkomen uit de narcose, hetgeen met matig ongerief gepaard gaat. Tevens kunnen deze dieren orgaanfalen ontwikkelen. Dit geldt voor een klein deel van zowel de muizen als de ratten. Het cumulatieve ongerief is voor 96-98% terminaal en voor 2-4% van de dieren matig. Voordat de dieren meer dan matig ongerief zullen ondervinden worden de humane eindpunten toegepast.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren onder anesthesie gaan en omdat de dieren worden gedood. Daarnaast zal bij een klein deel van de dieren bijkomen uit de narcose, waarbij er kans is op orgaanfalen.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht en het gedrag van de dieren of wanneer de dieren niet herstellen na de operatie.

Alleen bij onderzoeksvraag 3B zijn er humane eindpunten van toepassing, omdat de dieren dan bijkomen uit de narcose. Ondanks dat de dieren behandeld worden volgens de standaard klinische procedure en adequate pijnstilling krijgen, is het mogelijk dat de dieren last krijgen van orgaanfalen. Indien dit optreedt zullen deze dieren gedood worden. De overige humane eindpunten zijn: een gewichtsverlies van 15%, verminderde activiteit, gebogen rug en een onverzorgde vacht. De kans hierop is <5% muizen en 10% bij ratten. De humane eindpunten zijn niet van toepassing bij de terminale experimenten.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe

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.

Het bestuderen van de haarvaten in ernstig zieke patiënten is zeer lastig vanwege de complexe interactie van diverse systemen in het lichaam, zoals de bloedstroom, de binnenbekleding van de haarvaten en het ontstaan van schade in de organen. Deze complexe interactie maakt vervanging van de dierproeven door celweek onmogelijk, omdat er (nog) geen celweek modellen zijn die deze complexe interactie nabootsen. Daarnaast is de toediening van de meeste interventies in patiënten nog zeer experimenteel, en zijn meer dierstudies nodig om de effecten (op de doorbloeding) van deze middelen te kunnen bestuderen.

De keuze voor het gebruik van muizen en ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd.

Men gebruikt ratmodellen voor de

Voor het model gebruikt men de muis, omdat deze makkelijker genetisch te modificeren is dan de rat. De onderzoekers hebben met beide modellen veel ervaring.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

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

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Bovendien is de proefopzet erop gericht om zoveel mogelijk analyses te doen in een dier (verschillende technieken en tijdstippen).

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 1878 muizen en 2374 ratten 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.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe: n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

Alleen mannelijke dieren zullen worden gebruikt. Er is gekozen voor het gebruik van mannelijke muizen en ratten, omdat het meten van de doorbloeding in de haarvaten wordt gedaan met behulp van in vivo microscopie

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

Na het doden van de dieren zal men de organen en het bloed gebruiken voor moleculaire analyses. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is: *n.v.t.*

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

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

1. Benoem de centrale morele vraag

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag: Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de moleculaire systemen die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten en het ontwikkelen van nieuwe medicijnen tegen het lekken het gebruik van maximaal 1878 muizen en 2374 ratten, die daarvan terminaal tot matig ongerief ondervinden?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af.

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden terminaal tot maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel

wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van een nieuwe medicijnen om het lekken van haarvaten en zo orgaanfalen te verminderen.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 1878 muizen en 2374 ratten, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van kennis over de moleculaire systemen die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten, is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het verkrijgen van kennis over moleculaire systemen die betrokken zijn bij het lekken van de haarvaten. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een nieuwe medicijnen is afgewogen tegen het, terminaal tot matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief 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 1878 muizen en 2374 ratten, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. 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 (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Er is sprake van een substantieel maatschappelijk belang en een reëel wetenschappelijk belang. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over het lekken van de haarvaten en zullen mogelijk bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling hiervan.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. 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.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk belang en het reële wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 1878 muizen en 2374 ratten en het daarbij verwachte terminale tot maximaal matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B).

Er is geen dilemma geconstateerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam



**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
AVD1140020172144

Bijlagen

2

Datum 13 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 juni 2017. Het gaat om uw project "Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1140020172144. 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).

Datum:

13 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020172144

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
13 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020172144

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 64156338
Straat en huisnummer: De Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
IBAN: NL69RAVO1025169891
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: VUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:



Datum:
13 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020172144

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:



Gegevens gemachtigde

Naam:
Adres:
Postcode en plaats:
Wilt u een nieuwe machtiging
afgeven?



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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 september 2017

Geplande einddatum: 31 augustus 2022

Titel project: Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten

Titel niet-technische samenvatting: Herstel van lekkende haarvaten om de doorbloeding van organen te verbeteren en orgaanschade te voorkomen

Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum

Postadres DEC:

Amsterdam

E-mailadres DEC:

Betalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: ☒ Melding Machtiging
☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:

Functie:

Plaats:

Datum:

Amsterdam

12 juni 2017

Datum:

13 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020172144



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum



Van der Boechhorststraat 1117

1081 HV AMSTERDAM



**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
AVD1140020172144

Bijlagen

2

Datum 13 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 13 juni 2017

Vervaldatum: 13 juli 2017

Factuurnummer: 172144

Ordernummer: 4684861

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1140020172144	€ 1.287,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 28 juni 2017 9:12
Aan: 'Info-zbo'; [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD1140020172144

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Hartelijk dank voor uw vraag. Wij hebben gekozen om voor de andere experimenten ook mannelijke dieren in te zetten. De reden hiervoor is dat oestrogenen van grote invloed zijn tijdens bv. een [REDACTED]. Door deze hormonale invloed kunnen wij de onderlinge metingen niet meer met elkaar vergelijken. Als wij voor vrouwelijke dieren kiezen betekent dit dat wij dit voor alle experimenten moeten doen, maar ook mannelijke dieren als controle groep moeten inzetten om de invloed van oestrogenen op de doorbloeding van de haarvaten te bestuderen. Dit zal resulteren in een verdubbeling van het aantal dieren.

Ik hoop dat uw vraag hiermee voldoende beantwoord is. Indien er nog meer vragen zijn dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

VU University Medical Center, [REDACTED]
 [REDACTED] / www.vumc.com



De Boelelaan 1117, [REDACTED]
 1081 HV, Amsterdam, the Netherlands

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 27 juni 2017 15:39
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: vraag bij de behandeling van AVD1140020172144

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning gedaan. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een vraag. Het betreft uw project AVD1140020172144 getiteld: 'Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten'. U beschrijft het inzetten van mannelijke muizen omdat bij Intravitaal microscopie de doorbloeding van de haarvaten wordt gemeten [REDACTED]. Deze techniek wordt niet in alle dieren toegepast, kunt u bij de andere technieken ook uitsluitend mannelijke dieren inzetten of zou het ook mogelijk zijn voor die dieproeven vrouwelijke dieren in te zetten.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Namens **Centrale Commissie Dierproeven**
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam



**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
AVD1140020172144
Bijlagen
1

Datum 18 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten" met aanvraagnummer AVD1140020172144. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 28 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd de keuze voor het inzetten van mannelijke dieren te onderbouwen. Uw antwoorden zijn bij het dossier gevoegd deze hebben niet geleid tot aanpassingen in de formulieren.

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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op

12 juni 2017. 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. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:

18 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020172144

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).



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam

Adres: De Boelelaan 1117

Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Het verbeteren van de doorbloeding van de organen door het verminderen van het lekken van de haarvaten" met aanvraagnummer AVD1140020172144, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 12 juni 2017, ontvangen op 13 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 28 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 [REDACTED]				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	1.878	96% Terminaal 4% Matig	
3.4.4.2 [REDACTED]				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	2.374	98% Terminaal 2% Matig	

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
18 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020172144



Aanvraagnummer:
AVD1140020172144

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD1140020172144

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Aanvraagnummer:

AVD1140020172144

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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.