

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
nr.	documenten NTS20172265	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		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				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	



# 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](http://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?  Ja > Vul uw deelnemernummer in [redacted]  Nee > U kunt geen aanvraag doen

*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie [redacted]

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [redacted]

KvK-nummer [redacted]

1.3 Vul de gegevens van het postadres in. *Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

Straat en huisnummer [redacted]

Postbus [redacted]

Postcode en plaats [redacted] [redacted]

IBAN [redacted]

Tenaamstelling van het rekeningnummer [redacted]

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [redacted]  Dhr.  Mw.

Functie [redacted]

Afdeling [redacted]

Telefoonnummer [redacted]

E-mailadres [redacted]

1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [redacted]  Dhr.  Mw.

Functie [redacted]

Afdeling [redacted]

Telefoonnummer [redacted]

E-mailadres [redacted]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |            |   |
|-----------------------------|------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | [REDACTED] |   |
| Afdeling                    | [REDACTED] |   |
| Telefoonnummer              | [REDACTED] |   |
| E-mailadres                 | [REDACTED] |   |
- 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 - 9 - 2017 |
| Einddatum  | 1 - 9 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium-D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedingssupplement 3-HB
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |            |
|-------------|------------|
| Naam DEC    | [REDACTED] |
| Postadres   | [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*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.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 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	████████
Datum	- -
Handtekening	



## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Multiple Acyl Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD; or glutaric aciduria type II; OMIM #231680) is a rare inborn error of metabolism (IEM) with a heterogeneous clinical presentation ranging from patients with a neonatal-onset with congenital anomalies (type I) or with a neonatal-onset without congenital anomalies (type II) to patients with a relatively milder, later onset (type III). Severely affected MADD-patients (type I and II) typically display symptoms such as life-threatening metabolic derangement, cardiomyopathy, leukodystrophy and/or severe respiratory distress often resulting in neonatal death. Despite early diagnosis and treatment, these patients usually only survive from a few weeks up to a few years. Regular treatment includes dietary fat and protein restrictions, supplementation of riboflavin, glycine and L-carnitine and the avoidance of fasting. In case of metabolic derangement, glucose is administered to the patient to restore the metabolic balance. This treatment is generally sufficient in type III patients. There is no officially registered, efficacious treatment for severely ascertained type I and type II patients. Patients develop severe symptoms despite adhering to optimal treatment regimens, suggesting an additional energy shortage. [Frerman & Goodman 2004]

Ketone bodies form an important energy source for extra hepatic tissues such as skeletal and cardiac muscle. Contrarily to fatty acids, ketone bodies, like glucose, are able to cross the blood brain barrier. In healthy individuals, only low concentrations of ketone bodies are detectable in blood. Periods of metabolic stress such as fasting or starvation result in an increased mitochondrial fatty acid oxidation (mFAO) in order to meet the high energy tissue demands. This leads to increased concentrations of ketone bodies in blood, providing an alternative energy source for glucose. [Olpin 2003, Bouteldja 2014, Fukao 2014]

Patients with mFAO disorders including MADD are unable to oxidize fatty acids and form ketone bodies as an alternative energy source. This leads to a major disruption in the energy metabolism especially when the glucose supply becomes exhausted. [Olpin 2003] Supplementation of ketone bodies may provide an effective therapeutic option as it can bypass the shortfall in energy metabolism. The three ketone bodies are acetoacetate, 3-hydroxybutyrate (3-HB) and acetone. Whereas acetoacetate is chemically instable and acetone volatile,

This raises the prospect of a new treatment target in severe MADD and possibly other IEMs with a clinical presentation caused by energy deficiency. 3-HB supplementation has only been used in a compassionate use setting, as an experimental, therapeutic supplement in patients where all other treatment options had been exhausted and proven ineffective.

One of the remaining key issues for the limited clinical application of 3-HB in MADD-patients concerns the fact that the pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of 3-HB supplementation have not yet been elucidated.

### 3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The aim of this research project is to gain more insight in 3-HB supplementation by investigating the efficacy of supplementation of various 3-HB mixtures in terms of pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action.

[REDACTED]

### 3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Increased knowledge on pharmacokinetic parameters of 3-HB and the amount of 3-HB deposition in different tissues post-administration will improve the insight in 3-HB supplementation.

[REDACTED]

The experiments will be performed in a healthy as well as a diseased (MADD) rat model to investigate whether the pharmacokinetic parameters and tissue deposition of 3-HB mixtures are dependent on the metabolic capacity of the metabolism, in particular mFAO activity. If 3-HB uptake is increased in the diseased rat model compared to the healthy rat model, this emphasizes the importance of 3-HB supplementation in MADD-patients even more.

3-HB is currently supplemented in the form of sodium-D,L-3-hydroxybutyrate. As a result, the therapy needs to be considered with caution due to the iatrogenically increased sodium load.

This is an important contraindication for example, due to increased fluid retention. Fortunately, 3-HB supplementation appears to exert more positive than negative effects in the patients described so far. However, it remains a complex decision to start and/or withhold 3-HB supplementation and to increase and/or decrease the dosage due to the relatively limited amount of knowledge and evidence regarding 3-HB supplementation including the possible associated risks and mechanisms-of-action.

[REDACTED]

It is not possible to already perform these studies in patients without thorough substantiation in experimental animals. The patients requiring 3-HB supplementation are severely ill and have a vulnerable metabolic balance. Even minor influences such as slightly adjusting the current prescribed 3-HB therapy or an additional hospitalization to initiate the therapy adjustments are risk factors for life-threatening metabolic derangements in severe MADD. The proposed experiments in rats are therefore essential.

Altogether, this study will elucidate the pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of 3-HB supplementation. Therefore, it will provide a first step towards widespread application of this supplement for MADD-patients. 3-HB supplementation may also be beneficiary in other IEMs with a clinical presentation caused by energy deficiency. Study results may therefore be generalized to a larger population.

### 3.4 Research strategy

#### 3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

To answer research question A, we will investigate the pharmacokinetic parameters after administration of a single, oral dose of 3-HB. Five groups of nine healthy rats will receive one oral dose of 3-HB using various doses [REDACTED]. Venous blood samples will be collected at nine different time points between 0 minutes and 8 hours post-administration. These samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED]. These measurements will allow for calculation of the pharmacokinetic parameters. 3-HB levels will also be determined at these same time points using a blood  $\beta$ -ketone meter in order to investigate the accuracy of the device and to establish the potential of its application in patients under these circumstances. It should be noted that measurements with the  $\beta$ -ketone meter cannot replace the venous blood samples since this device does not allow for [REDACTED]. After completion of the experiment and termination, the following tissue samples will be collected: skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue for further analysis according to standard procedures of experiment B in the context of possible sample size reduction (see 3.4.3).

To answer research question B, we will analyze 3-HB deposition in different tissues at three different time points post-administration:  $t_{\max}$  (identified in experiment A), one time point before  $t_{\max}$  and one time point at a maximum of 24 hours after  $t_{\max}$ . To this end, healthy rats will be divided among three groups of each nine rats. Each group will receive the same optimal 3-HB dose (identified in experiment A; first dosage which reaches peak plasma concentration in shortest time interval), but sacrificed at a different time point post-administration. Venous blood samples will be collected at up to nine different time points between 0 minutes post-administration and time of termination. At all moments of venous blood collection, a blood  $\beta$ -ketone meter will additionally be used for immediate measurement of the 3-HB concentration for similar reasons as described before. After termination, the following tissue samples will be collected: skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue. All blood samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED]. This will allow for calculation of the pharmacokinetic parameters. 3-HB, [REDACTED] will also be analyzed in tissue homogenates in order to determine the deposition of the respective metabolites in the different tissues.

To answer question C, we will investigate the pharmacokinetic parameters and organ tissue deposition after a single oral dosage of four different [REDACTED] 3-HB mixtures at two different time points:  $t_{\max}$  (identified in experiment A) and the time point at a maximum of 24 hours after  $t_{\max}$ . Four groups of nine rats will receive the same optimal 3-HB dosage (identified in experiment A) in different [REDACTED] mixtures [REDACTED] and will be terminated at  $t_{\max}$ . Four other groups of nine rats will receive the same optimal 3-HB dosage in different [REDACTED] mixtures [REDACTED] but will be terminated at the second time point. Venous blood samples will be collected at up to nine different time points between 0 minutes post-administration and time of termination. At all moments of venous blood collection, a blood  $\beta$ -ketone meter will additionally be used for immediate measurement of the 3-HB concentration for similar reasons as described before. After termination, the following tissue samples will be collected: skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue. All blood samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED]. This will allow for calculation of the pharmacokinetic parameters. 3-HB, [REDACTED] will also be analyzed in tissue homogenates in order to determine the deposition of the respective metabolites in the different tissues.

The three research questions will first be addressed in a healthy rat model. In order to investigate whether the pharmacokinetic parameters and organ tissue deposition of 3-HB mixtures are dependent on the activity of the metabolism, the three experiments will be exactly repeated in a MADD rat model: riboflavin deficient rats. [Goodman 1981, Olpin 1982, Ross 1987, Montgomery 1991] As the



pharmacokinetic parameters and organ tissue deposition might be influenced by the activity of the metabolism, the optimal 3-HB dose and  $t_{max}$  may be different between the healthy and diseased model. Therefore it is not possible to limit the number of groups in the MADD rat model experiments based on the outcomes of the experiments in the healthy rat model.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

In this experiment, we are focusing on the pharmacokinetic parameters of 3-HB and its deposition in different tissues rather than on the therapeutic effects of 3-HB supplementation. It is not possible to perform these experiments 3-HB-patients as this would potentially impose life-threatening risks. It is also not possible to perform these experiments in healthy subjects or patients, as 3-HB tissue deposition cannot be determined without invasive tissue dissection for further analysis. Investigations in an in vitro model (i.e. fibroblasts studies) are not applicable as this does not provide an adequate model system to assess pharmacokinetic parameters, and to determine tissue 3-HB deposition. An in vivo model (i.e. an intact organism) is required to determine the contribution of different organs to the abovementioned parameters. It is considered a good starting point to study these mechanisms in a healthy animal model first and subsequently in a diseased animal model. As a genetically modified MADD-rodent-model does not exist, alternatives have been considered. In the past, riboflavin deficient rats have been used as an animal model for MADD. Despite the fact that dietary induced riboflavin deficiency in rats does not induce severe (neonatal) disease symptoms, this model mimics the biochemical and metabolic status of MADD-patients caused by a reduced mFAO activity. [Goodman 1981, Olpin 1982, Ross 1987, Montgomery 1991] In reproductive performance experiments, dietary induced riboflavin deficiency in young female rats led to severely impaired reproduction and fetal resorption. [Duerden 1985] Therefore, dietary induced riboflavin deficiency in rats serves as an appropriate alternative animal model for MADD in order to investigate whether the pharmacokinetic parameters, tissue deposition and optimal composition of the 3-HB mixture are dependent on the activity of the metabolism, in particular mFAO.

Repetitive blood sampling in a short time interval is necessary in this experiment. Having considered the blood volume in both animal species, we will use a rat model instead of a mouse model for our studies. The type of experimental procedures that will be performed include: reversal of light-dark cycle, weighing, identification method, administration of single, oral dose of 3-HB via oral gavage technique, repetitive blood sampling, terminal cardiac puncture and termination via cervical dislocation both under inhalation anaesthesia. The overall level of discomfort for the animals in the healthy animal model is estimated to be mild. Additionally, experiments A, B & C will be performed in a rat model for MADD. To this end, riboflavin deficiency will be induced via a riboflavin deficient diet prior to the start of the experimental procedures. This diet will be continued during the experiments. The overall level of discomfort for those animals is estimated to be moderate due to the modified dietary regimen.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Experiment B & C depend on the outcome of experiment A as the optimal dose and  $t_{max}$  which are identified in experiment A, will be used in experiment B & C. If possible, depending on the established  $t_{max}$ , animal tissues of an animal group of experiment A will be further analyzed according to standard procedures of experiment B, to already form one of the two additional time point groups of experiment B. The animals of experiment B, [REDACTED], will serve as control group for experiment C.

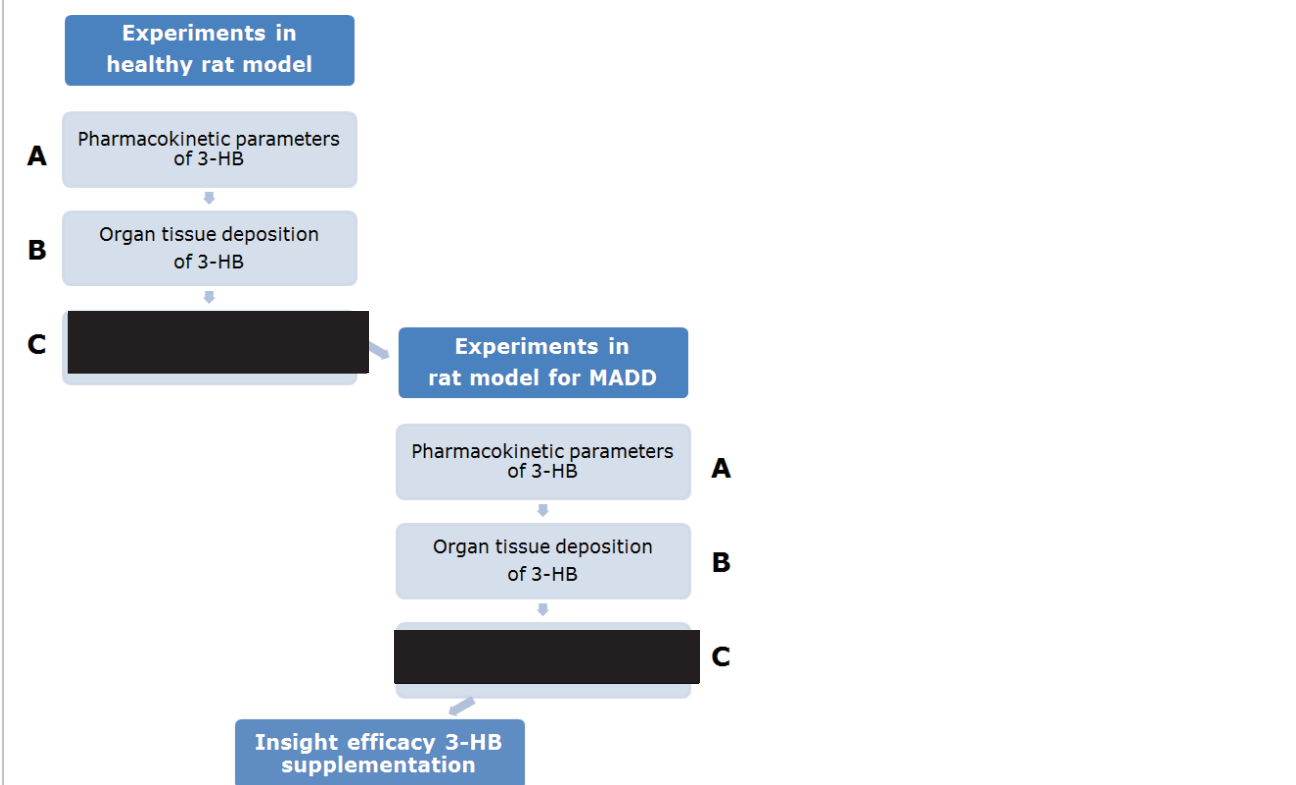
After experiment A, a new power analysis will also be performed based on the VC and effect size in this experiment to evaluate whether the number of animals per group in experiment B & C should be adapted.

The experiments in the MADD rat model will only be performed after completion of the experiments in healthy rats. A go/no-go criteria for the start of the experiments in the MADD rat model is confirmation of dietary induced riboflavin deficiency through the activation coefficient of erythrocyte glutathione reductase (EGRAC) [Prentice 1981, Olpin 1982]. An EGRAC status of  $\geq 1.3$  will be considered as proven

riboflavin deficiency. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7<sup>e</sup> edition]

If at any point during the experiments, administration of 3-HB to the rats or the dietary inducement of riboflavin deficiency is proven to be toxic or harmful and results in death of the animal or non-acceptable side effects, possible causes will be investigated thoroughly. The causative factor (for example high 3-HB dose) will be excluded from all subsequent experiments. Only if the 3-HB supplementation is well tolerated by the animals, the experiment will be continued with the next step.

A schematic representation of the experiments is shown in the figure below. Together all experiments will provide improved insight on pharmacokinetic parameters and tissue deposition of various mixtures of 3-HB post-administration.



3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Pharmacokinetics parameters and 3-HB deposition in organ tissues after supplementation of various 3-HB mixtures
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	





## Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

[Redacted]

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

[Redacted]

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Pharmacokinetics parameters and 3-HB deposition in organ tissues after supplementation of various 3-HB mixtures

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The aim of this experiment is to gain more insight in 3-HB supplementation by investigating the efficacy of supplementation of various 3-HB mixtures in terms of pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action.

[Redacted]

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Experimental studies will start after two weeks of acclimatization. The animals will be group housed during the acclimatization period and throughout all experiments. Drinking water and standard laboratory diet will be provided at libitum. Because the ketone body metabolism is affected by the circadian rhythm

[Gasquet 1977, Allen 2008], the 12 hour light - 12 hour dark cycle of the rats will be reversed directly upon arrival at the facility. Ketone body concentrations in rats are highest during night time, corresponding with the rodent's activity period. Experiments will only be performed after reversal of the light-dark cycle to ensure that the circadian rhythm (and thus activity period) of the rat mimics the human activity period as much as possible during the experiments. Prior to the start of the experiment, all rats will be weighed to ensure a minimal weight of 300 grams. A control blood sample will be collected (200  $\mu$ L) via the tail vein. [REDACTED]

The dosages of the 3-HB supplementation in rats are based on the dosage regimens of 3-HB supplementation in MADD-patients. [REDACTED]

[REDACTED] Therefore, determined pharmacokinetic parameters and 3-HB deposition in tissues in rats can be translated back to the human situation as accurately as possible.

For experiment A, rats will be randomly divided into five dosage groups of nine rats which all receive one oral dose of 3-HB at an increased dosage [REDACTED]. The group-corresponding oral dose of 3-HB will be administered via oral gavage technique. Venous blood samples (200  $\mu$ L) will subsequently be collected at nine different time points between 0 minutes and 8 hours post-administration via tail vein bleeding to determine the concentration of [REDACTED]. The blood sample at the time of sacrifice (t=8 hours) will be collected as terminal bleed via cardiac puncture. At all moments of blood collection, a blood  $\beta$ -ketone meter will be used for immediate, cage-side measurement of 3-HB concentration (samples of 5  $\mu$ L each, collected via tail vein bleeding) in order to investigate the accuracy of the device and consider the potential application in patients under these circumstances. They cannot replace the venous blood samples since a blood  $\beta$ -ketone meter does not allow for determination of [REDACTED]. Measurements with this device will be compared with the gold standard of laboratory analyses in order to test whether this device might be applicable in the monitoring of 3-HB concentrations in patients on 3-HB supplementation. At t=8 hours, all animals will be deeply anaesthetized by the inhalation anaesthetic isoflurane. A heart puncture will be performed to collect the terminal blood sample. The animals will subsequently be euthanized by cervical dislocation. All blood samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED]

[REDACTED] After completion of the experiment and termination, the following tissue samples will be collected: skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue for further analysis according to standard procedures of experiment B in the context of possible sample size reduction (see 2.D).

For experiment B, rats will be randomly divided into three groups of nine rats. Each group rats will be sacrificed at a different time point:  $t_{\max}$  (identified in experiment A), one time point before  $t_{\max}$  and one time point at a maximum of 24 hours after  $t_{\max}$ . The optimal 3-HB dose identified in phase A of the experiment (first dose which reaches peak plasma concentration in shortest time interval) will be administered to each rat via oral gavage technique. Venous blood samples (200  $\mu$ L) will be collected at

up to 9 different time points between 0 minutes post-administration and time of termination. These blood samples will be collected via tail vein bleeding. The blood sample at the time of sacrifice will be collected as terminal bleed via cardiac puncture. At all moments of blood collection, a blood  $\beta$ -ketone meter will be used for immediate, cage-side measurement of 3-HB concentration (samples of 5  $\mu$ L each, collected via tail vein bleeding) for similar reasons as described before. Each group of animals will be sacrificed at the group-corresponding time point. At the time point of sacrifice, animals will be deeply anesthetized by the inhalation anaesthetic isoflurane. A heart puncture will be performed to collect the terminal blood sample. The animals will subsequently be euthanized by cervical dislocation. After sacrifice, the different tissues (skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue) will be collected for measurement of [REDACTED] in order to determine the tissue deposition. All collected blood samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED] as described before. This will allow for calculation of the pharmacokinetic parameters.

For experiment C, rats will be randomly divided into eight groups of nine rats. Four groups will receive the optimal 3-HB dosage (identified in experiment A) but in different [REDACTED] mixtures [REDACTED] and be sacrificed at  $t_{max}$  (identified in experiment A). The four remaining groups of nine rats will receive the same optimal 3-HB dosage in different [REDACTED] mixtures [REDACTED] but be terminated at another time point at a maximum of 24 hours after  $t_{max}$ . The single dosages of 3-HB will be administered via oral gavage technique. Venous blood samples (200  $\mu$ L) will be collected at up to 9 different time points between 0 minutes post-administration and time of termination via tail vein bleeding. The blood sample at the time of sacrifice will be collected as terminal bleed via cardiac puncture. At all moments of blood collection, a blood  $\beta$ -ketone meter will be used for immediate, cage-side measurement of 3-HB concentration (samples of 5  $\mu$ L each, collected via tail vein bleeding) for similar reasons described under experiment A. At the group-corresponding time point, animals will be deeply anesthetized by the inhalation anaesthetic isoflurane. A heart puncture will be performed to collect the terminal blood sample. The animals will subsequently be euthanized by cervical dislocation. After sacrifice, the different tissues (skeletal muscle-, liver-, heart- and brain tissue) will be collected for measurement of [REDACTED] in order to determine the tissue deposition. All blood samples will be further analyzed for concentrations of [REDACTED] as described before. This will result in calculation of the pharmacokinetic parameters.

Experiments A, B & C will be repeated exactly in riboflavin deficient rats, an animal model for MADD [Goodman 1981, Olpin 1982, Ross 1987, Montgomery 1991], in order to investigate whether the pharmacokinetic parameters and tissue deposition of 3-HB mixtures are dependent on the metabolic capacity of the metabolism, in particular the mitochondrial fatty acid oxidation activity. Riboflavin deficiency will be induced via a riboflavin deficient diet prior to the experiment for approximately 6 weeks. The diet will be provided ad libitum and continued during the experiments. All rats will be weighed prior to the start of the riboflavin deficient diet and consistently each subsequent week.

---

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Due to lack of information on variability and effect size for these specific experiments, it is not possible to perform a power analysis for sample size calculation. Based on our experience that the variation coefficient (VC) for metabolic parameters such as blood glucose and ketone body levels is generally about 15%, and effect size about 25%, we expect a sample size of nine animal per group (power = 90%).

Therefore, the sample size for experiment A is calculated to be nine animals per group. The total number of animals in this experiment is 5 (groups) x 9 (animals/group) x 2 (healthy model and MADD model) = 90 rats.

The sample size for experiment B is calculated to be nine animals per group. The total number of animals in this experiment is 3 (groups) x 9 (animals/group) x 2 (healthy model and MADD model) = 54 rats.

---

The sample size for experiment C is calculated to be nine animals per group. The total number of animals in this experiment is 4 (groups) x 9 (animals/group) x 2 (time point) x 2 (healthy model and MADD model) = 144 rats.

Therefore, 288 rats in total will be included in this experiment. No additional rats will be enrolled as no drop-out due to the short duration of the experiments is expected. After experiment A, a new power analysis will be performed based on the VC and effect size in this experiment to evaluate whether the number of animals per group in experiment B & C should be adapted.

### **B. The animals**

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Healthy, inbred male Wistar rats weighing  $\geq 300$  g, will be used in the experiments. The total number of animals used is 288 rats. Calculation of the sample size has been explained above. Having regard to the total amount of blood volume of the animal species (since the experiments concern repetitive blood sampling), experiments cannot be performed in mice. Only rats with a weight of 300 g or more will be included to ensure that total volume of blood sample collections does never exceed 10% of the total amount of the animal's blood volume. The mean blood volume of a 300 g weighing rat is 19.2 mL (estimated blood volume in a rat is 64 mL/kg [Diehl 2001]), thus total amount of blood collection per rat should not exceed 1.92 mL. During the experiment a maximum of 10 blood samples (200  $\mu$ L) + simultaneous cage-side measurement with a blood  $\beta$ -ketone meter (5  $\mu$ L) (in total 205  $\mu$ L per sample) will be collected, including one terminal blood sample. Therefore, a maximum of  $9 \times 205 \mu\text{L} = 1.845$  mL blood will be collected during the experiment. Thus, the total amount of blood collected during the experiment will never exceed 10% of the animal's total blood volume.

All experiments will only be performed in male Wistar rats for multiple reasons. Only male rats will be used as the ketone body metabolism activity differs between male and female sex, possibly due to different plasma levels of estradiol. [Jikumaru 2007] Therefore, the reproductive cycle in female rats might interfere with the study results due to alterations in the estrous cycle. The strain Wistar rats is widely used for pharmacokinetic experiments in rats.

[REDACTED], established pharmacokinetic parameters and 3-HB deposition in tissues in rats can be translated to the human situation as accurately as possible. As it is unknown to what extent ketone body metabolism differs among different strains of rats and/or is influenced by the sex different effects, all experiments will be performed in male Wistar rats in order to avoid confounding factors as much as possible.

### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

### **D. Replacement, reduction, refinement**

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: In these experiments, the pharmacokinetic parameters and tissue deposition after a single, oral dose 3-HB will be investigated in a healthy animal model and a diseased animal model with compromised FAO capacity. We are interested in the pharmacokinetic parameters of 3-HB and tissue deposition of 3-HB mixtures rather than the therapeutic effects. It is considered a good starting point to first study these mechanisms in a healthy animal model. Investigations in an in vitro model (i.e. fibroblast studies) are not applicable as this approach does not provide an adequate model for the assessment of pharmacokinetic parameters in vivo, and for determination of 3-HB deposition in tissues. An in vivo model (i.e. an intact organism) is required to account for the contribution of different cells and organs to the abovementioned parameters. Invertebrates cannot be used due to their limited blood volume and the inability of adequate dose administration. It is not possible to perform these experiments or already attempt a similar approach in patients without thorough substantiation. The patients requiring 3-HB supplementation are severely ill and have a vulnerable metabolic balance. Even minor influences such as slightly adjusting the current prescribed therapy or an additional hospitalization to initiate the therapy adjustments are risk factors for life-threatening metabolic derangements in severe MADD. The proposed experiments in rats are therefore essential. Additionally, the context of the experiment requires tissue excision for further analysis to determine the 3-HB deposition in specific organs, and can therefore not be performed in healthy humans or patients.

Reduction: Sample size calculations have been performed to minimize the number of animals needed as much as possible. After experiment A, a new power analysis will be performed based on the VC and effect size in this experiment to evaluate whether the number of animals per group in experiment B & C can be further reduced. The optimal dose and  $t_{max}$  discovered in experiments A will be used in experiments B & C. Therefore, experiment B and C can be performed with a minimum number of rats as only one dose concentration needs to be investigated and  $t_{max}$  has already been established. If possible, depending on the established  $t_{max}$ , animal tissues of an animal group of experiment A will be further analyzed according to standard procedures of experiment B, to already form one of the two additional time point groups of experiment B, thereby reducing the number of animals. This requires that we will collect and store the tissues of animals in experiment A also. The animals of experiment B, which receive a racemic 3-HB mixture, will serve as control group for experiment C. Regarding the experiments in a healthy as well as a MADD rat model, as the pharmacokinetic parameters and tissue deposition might be influenced by the metabolic activity, the optimal 3-HB dose and  $t_{max}$  might differ between both models. Therefore it is not possible to limit the number of groups in the MADD rat model experiments based on the outcomes of the experiments in the healthy rat model.

After careful consideration, we decided not to include a Latin square (two times a 5x5 square for testing 5 dosages with  $n=10$  per sample; thus 20 animals required for experiment A in both models) in the experimental design of experiment A for the following reasons:

- To enable the use of a Latin square, additional animal experiments are required to determine the 3-HB half-life and the duration of substrate presence in the tissues as these factors might influence the pharmacokinetic parameters. The 3-HB half-life should be known to determine the minimum wash-out period. Additionally, the amount of 3-HB uptake by the tissues might be influenced by the degree of 3-HB tissue saturation. It is unknown how long the 3-HB is present in the different tissues. A minimum of 36 additional animals is required to investigate these possible confounding factors in the healthy and MADD model (9 animals per model for the 3-HB half-life and 9 animals per model to determine the duration of substrate presence) at only one additional time point. To enable adequate interpretation of results, this should be carried out at multiple timepoints, requiring even more animals.
- It is practically not feasible as experiment A requires repetitive blood sampling in a short time interval. If experiment A is performed according to a Latin square, the total volume of blood sample collections would exceed 10% of the total amount of the animal's blood volume. Therefore after each tested dosage, an additional recovery period of at least 2 weeks is necessary for the recovery of blood volume for animal welfare reasons as well as to exclude hemodynamic effects as influencing factors in the subsequent dosage tests. [Diehl 2001]



Therefore, total duration of experiment A per animal will reach at least 11 weeks instead of 8 hours.

- In the context of animal welfare, this does not seem desirable.
  - Metabolic activity, including ketone body metabolism, might be influenced by age. [Bougneres 1986, Higashino-Matsui 2012] When using a Latin square, this confounding factor cannot be ruled out and results cannot be compared adequately.
  - This approach will deliver a significant study delay of about 3 months.
- With this experimental design it is not possible to “further use” the tissues of the animals from experiment A as a group in experiment B since it is unknown how long the 3-HB substrates remain present in the tissues after repeated administration of different dosages. Consequently, the proposed reduction of potentially 18 animals (9 animals per model) is no longer possible.

Refinement: Experimental procedures will be executed by trained and experienced staff. The experiment has been divided into different subparts in order to enable the implementation of clear go/no go criteria. Only if 3-HB dosages administered in experiment A turn out to be tolerated well by the animals, we will continue with experiment B and subsequently experiment C. Only after completion of all experiments in a healthy animal model, experiments will be repeated in a diseased animal model. Reversal of the light-dark cycle will be performed directly after arrival at the facility. The animals are already in a box upon arrival. Therefore, introducing the reversed rhythm as a normal rhythm immediately upon arrival will cause a lesser amount of stress rather than adapting the rhythm at a later stage. Experiments will only start after two weeks of acclimatization in order to minimize the stress experience. The method of blood sample collection by tail-nick procedure was chosen based from the perspective of animal welfare as we expect that it will impose the least discomfort to the animals.

The animals included in the MADD model will receive a riboflavin deficient diet prior to the start and throughout the experiment. The biochemical status of riboflavin deficiency will be achieved within approximately six weeks. [Prentice 1981, Olpin 1982, Liao 1987, Ross 1987, Patterson 1988] This will be confirmed by analysis of the activation coefficient of erythrocyte glutathione reductase (EGRAC) in washed erythrocyte preparations [Prentice 1981, Olpin 1982] isolated from a control blood sample (200  $\mu$ L) collected one to two days before the start of the experiment in order to allow for sufficient recovery time from this blood draw. An EGRAC status of  $\geq 1.3$  will be considered as proven riboflavin deficiency. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7<sup>e</sup> edition] Other relevant metabolites which can be used to improve characterization of the model will also be measured such as acylcarnitines, organic acids, amino acids, acetoacetate, lactate and electrolytes. A small residual content of riboflavin allows for continued growth and/or prevention of excessive weight loss and prevents overt clinical signs of deficiency such as alopecia, weakness, decreased growth and dermatitis. [Prentice 1980, Nutritional Requirements of Laboratory Animals 1995, Yates 2001] Therefore, the diet will not be entirely depleted from riboflavin, but will still contain a reduced amount of riboflavin to minimize the risk of the most severe side-effects. Dietary induced riboflavin deficiency in rats does not induce severe (neonatal) disease symptoms similar to severely ascertained MADD-patients. However, this model mimics the biochemical and metabolic status of MADD-patients caused by a reduced mFAO activity. [Goodman 1981, Olpin 1982, Ross 1987, Montgomery 1991] In reproductive performance experiments, dietary induced riboflavin deficiency in young female rats led to severely impaired reproduction and fetal resorption. [Duerden 1985] Therefore, dietary induced riboflavin deficiency in rats can be used as an alternative animal model for MADD in order to investigate whether the activity of the metabolism, in particular mFAO, influences the main outcome parameters.

During the acclimatization period, if applicable the period of dietary inducement of riboflavin deficiency, and the subsequent experiments, all animals will be checked once a day to determine their general health status and assess the grade of discomfort the animal is possibly experiencing. This daily check also ensures that in the unlikely event a humane endpoint is reached, this will be noticed quickly and precaution measures can be implemented immediately.

---

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects

on the environment.

The overall level of discomfort for the rats in the healthy animal model is estimated to be mild. The overall level of discomfort for the MADD rats is estimated to be moderate due to the modified dietary regimen. To refine the experiment several precautionary measurements will be taken. Regarding the repetitive blood sampling in the context of the experiment: the first blood samples will be collected via a small cut in the lateral tail vein. Subsequent serial blood samples will be obtained by gently removing the scab without performing an additional cut. Rats included in the MADD group will be fed a riboflavin deficient diet. To minimize the risk on side-effects, the diet will not be entirely depleted from riboflavin. A small residual content of riboflavin allows for continued growth and/or prevention of excessive weight loss and prevents overt clinical signs of deficiency. [Prentice 1980, Nutritional Requirements of Laboratory Animals 1995, Yates 2001] Therefore, the modified diet will contain a reduced amount of riboflavin. Apart from mimicking the biochemical and metabolic status of MADD-patients, no disease symptoms similar to the severe (neonatal) disease phenotype in patients are to be expected. [Goodman 1981, Olpin 1982, Ross 1987, Montgomery 1991]

If at any point during the experiments, administration of 3-HB to the rats is proven to be toxic and results in death of the animal or non-acceptable side effects, possible causes will be investigated thoroughly. We will discuss the case extensively with the Animal Welfare Body. The causative factor (for example high 3-HB dose) will be excluded from all subsequent experiments. Only if the 3-HB supplementation is well tolerated by the animals, the experiment will be continued with the next step. The same holds for the induced riboflavin deficiency using a riboflavin deficient diet. If at any point, the modified dietary regimen results in overt clinical signs of deficiency, the diet and experiment will be terminated. Only if the riboflavin deficient diet is well tolerated by the animals, the experiment will be continued with the next step.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

An extensive literature search has been performed in order to ensure that the proposed experiments have not been performed previously.

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The animals included MADD rat model group will receive a riboflavin deficient diet prior to the start and during the experiment. The modified diet is required to induce riboflavin deficiency in the respective rats and thus create a diseased animal model which mimics the biochemical status and metabolic capacity of MADD-patients.

### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and

treatment of the animals will be ensured.

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Unintended side-effects of the 3-HB or adverse effects of the administration method. Unintended side-effects of the modified dietary regimen in rats included in the experiments in the MADD rat model.

Explain why these effects may emerge.

A possible side-effect of 3-HB supplementation in humans includes the occurrence of diarrhoea. It is expected this side effect only occurs after long-term and particularly high dose 3-HB supplementation. Long-term diarrhoea might result in dehydration. Potential adverse effects of the administration method via oral gavage technique are perforation of the oesophagus or stomach or respiratory distress. Potential side-effects of dietary induced riboflavin deficiency involve alopecia, weakness, decreased growth and dermatitis. [Nutritional Requirements of Laboratory Animals 1995]

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Rats will receive the 3-HB dose only once. In experiment A, all rats will already be euthanized within 8 hours. In experiment B & C, all rats will be euthanized at a maximum of 24 hours after  $t_{max}$ . Furthermore, all rats will receive only a single, optimal dose of 3-HB. Therefore the occurrence of diarrhoea and subsequent dehydration is considered unlikely.

In the event diarrhoea does occur, animals will be carefully monitored for signs of dehydration such as sunken eye sockets a dull coat, reduced elasticity of the skin and less active or lethargic behaviour. In case of temporary diarrhoea, the experiment will be continued. In case of diarrhoea which persists for longer than 8 hours or present signs of dehydration, the experiment will be prematurely terminated for the individual animal.

Administration via oral gavage will only be performed by trained personnel. Directly afterwards, animals will be carefully monitored for signs of laboured breathing or respiratory distress for 5 minutes. If these signs are present and persistent, the experiment will be prematurely terminated for the individual animal.

A small residual content of riboflavin allows for continued growth and/or prevention of excessive weight loss and prevents overt clinical signs of deficiency. [Prentice 1980, Nutritional Requirements of Laboratory Animals 1995, Yates 2001] Therefore, the diet will not be entirely depleted from riboflavin, but will still contain a reduced amount of riboflavin to minimize the risk on side-effects. In the event clinical signs of riboflavin deficiency do occur, the experiment will be prematurely terminated for the individual animal according to the defined humane endpoints.

### J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

If a humane endpoint is suspected in an individual animal, the case will be discussed with the Animal Welfare Officer. The experiment will be prematurely terminated for an individual animal in case it has been determined that a humane endpoint has been reached. Humane endpoints are defined as pica-behaviour (defined as eating bedding material or other strange, non-food objects) or other signs of pathology, such as weight loss of 15% or more of the initial body weight, decreased grooming apparent by an unkempt coat and/or the presence of "red tears" for  $\geq 24$  hours. No a priori reasons for euthanization of the animals will be: temporary nausea (defined as temporarily lifting of head in a motion resembling gagging, for  $\leq 8$  hours) or temporary diarrhea (for  $\leq 8$  hours). If the nausea and/or diarrhea is present for  $\geq 8$  hours or combined with signs of dehydration, the experiment will be prematurely terminated for an individual animal.

Prior to the experiments in the MADD rat model, riboflavin deficiency will be induced using a riboflavin deficient diet. If inducement of riboflavin deficiency via a riboflavin deficient diet results in any of the abovementioned situations, specifically a weight loss of 15% or more of the initial body weight at the start of the modified dietary regimen, alopecia, profound weakness or dermatitis, the diet will be discontinued and the case will be discussed with the Animal Welfare Officer. If a humane endpoint has been reached, the experiment will not be initiated or, in case it has already started, the experiment will be stopped. In both cases, the animal will be prematurely terminated.

Indicate the likely incidence.

As a) only a single oral dose of 3-HB is administered to the rats and b) the duration for the proposed experiments varies between only eight hours to a maximum of 24 hours after  $t_{max}$ , we do not expect that any individual rat will reach a humane endpoint requiring termination of the experiment to reduce further distress. In the experiments in a MADD rat model, animals will be fed a riboflavin deficient diet prior to the start of the experiment to induce riboflavin deficiency. Due to the small residual content of riboflavin in the modified diet, the occurrence of side-effects mentioned before is unlikely. Animals will be checked daily from the day of start of the modified dietary regimen to ensure that in the unlikely event a humane endpoint is reached, this will be noticed quickly and precaution measures can be implemented immediately.

#### **K. Classification of severity of procedures**

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Reversal of the light-dark cycle: directly upon arrival at the facility, the 12 hour light - 12 hour dark cycle of the rats will be reversed. The experiments will only start after two weeks of acclimatization. The discomfort is expected to be mild.

Weighing: All rats will be weighed prior to the start of the experiment to ensure a minimal weight of 300 grams. In the experiments in the MADD model, all rats will also be weighed prior to the start of the riboflavin deficient diet and consistently once a week in each subsequent week. The discomfort is expected to be mild.

Identification method: Animals will be identified using an indelible mark on the tail. The discomfort is expected to be mild.

Administration of 3-HB dose: administration of the substance will be performed via oral gavage technique. The reason for the use of this administration method is that it allows for standardization of the amount of 3-HB that the rats will receive. This administration method ensures precise and accurate dosing. Furthermore, it mimics the least invasive mode of delivery in humans. All rats will receive only one, single dose of 3-HB. The maximum dose volume will not exceed 10 mL/kg. The discomfort is expected to be mild.

Repetitive blood sampling: Total amount of collected blood will not exceed 10% of the total blood volume

of the rat. The first blood samples will be collected via a small cut in the lateral tail vein. Subsequent serial blood samples will be obtained by gently removing the scab without performing an additional cut. If necessary, sample collection will be facilitated by applying gently pressure proximal to the collection site to occlude venous return. The discomfort is expected to be mild.

Termination: at the end of the experiment, the rats will be euthanized by cervical dislocation after being anaesthetized deeply with the inhalation anaesthetic isoflurane. A terminal bleed will be collected via cardiac puncture before sacrifice. The discomfort is expected to be mild.

Riboflavin deficient diet: all rats included in the experiments in a MADD model will receive a riboflavin deficient diet prior to the experiment in order to induce riboflavin deficiency. The modified diet will be continued during the experiment. The discomfort is expected to be moderate.

For all rats included in experiment A, B & C in the healthy rat model, the total level of discomfort is expected to be mild. For all rats included in experiment A, B & C in the MADD rat model, the total level of discomfort is expected to be moderate due to the dietary induced riboflavin deficiency. Estimated levels of discomfort for the remaining animal procedures in these experiments are the same as in the experiments in the healthy rat model.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Animals in all experiments will be killed in the context of the experiment. If possible, depending on the established  $t_{max}$ , animal tissues of an animal group of experiment A will be further analyzed according to standard procedures of experiment B, to already form one of the two additional time point groups of experiment B. Therefore, tissue samples will also be collected in experiment A to enable further analysis in the context of possible sample size reduction. Moreover, the half-life of 3-HB in rats is unknown. Re-using the animals of experiment A for subsequent experiments may lead to incorrectly interpreted results as the half-life of 3-HB and duration of substrate presence in the tissues is unknown.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: [REDACTED]
2. Titel van het project: **Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats**
3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedings supplement 3-HB**
4. Type aanvraag:  
**X nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: [REDACTED]
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **01-06-2017**
  - aanvraag compleet: **01-06-2017**
  - in vergadering besproken: **08-06-2017**
  - anderszins behandeld: **14-06-2017**
  - termijnonderbreking(en) van / tot: **09-06-2017 tot 14-06-2017**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **14-06-2017**
  - advies aan CCD: **20-06-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.  
**De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.**
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Gestelde vraag / vragen
  - Verstrekt(e) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: **09-06-2017**
  - Gestelde vraag/vragen:

1/ In de bijlage onder 2A geeft u aan dat één van de onderzoeksvragen is "What are the pharmacokinetic parameters after a single, oral dose of 3-HB in terms of peak plasma concentration (C<sub>max</sub>), time to reach the C<sub>max</sub> (t<sub>max</sub>) and the elimination half-life (t<sub>1/2</sub>)?". De herhaalde bloedmonstername na de eenmalige orale toediening van een ketonlichaam in fase A zou in het kader van de farmacokinetiek moeten kunnen leiden tot vaststelling van de eliminatie t<sub>1/2</sub> van het betreffende

ketonlichaam. Kun U nader toelichten wat bedoeld wordt met de suggestie dat u 9 dieren extra nodig zou hebben ter bepaling van de  $t_{1/2}$  van het betreffende ketonlichaam, zoals aangegeven onder vermindering en de vermelding dat "the half-life of 3-HB in rats is unknown", zoals aangegeven onder L. wijze van doden?

2/ Kunt u toelichten waarom U een relatief hoge power van 0,9 hanteert?

3/ Onder vervanging geeft u aan dat "We are interested in the pharmacokinetic parameters of 3-HB and tissue deposition of 3-HB mixtures rather than the therapeutic effects." Kunt U dit toelichten?

4/ U voorziet gebruik van een diermodel (riboflavin deficient rats, an animal model for MADD) nog niet in zwang in [REDACTED]. Bij welke (relatieve) waarde c.q. effect size van de "activation coefficient of erythrocyte GR" acht u dit diermodel niet valide voor uw onderzoek en ziet u dit mogelijk als go/no go moment?

**Datum antwoord: 14-06-2017**

**Verstrekt(e) antwoord(en):**

1. Dat klopt. Na het uitvoeren van de experimenten kan de 3-HB halfwaardetijd worden berekend.

1a Met de 9 extra dieren die onder "2.D – sectie vermindering" worden genoemd wordt bedoeld dat, indien experiment A middels een Latijns vierkant wordt uitgevoerd, de halfwaardetijd van tevoren dient te worden bepaald om de minimale wash out periode te bepalen. Wij hebben echter na zorgvuldige overwegingen, zoals beschreven in de projectbijlage onder "2.D – sectie vermindering", afgezien van het gebruik van een Latijns vierkant. Van het gebruik van deze additionele 9 dieren voor het bepalen van de halfwaardetijd voorafgaande aan het experiment is dan ook geen sprake.

1b Tot op heden is de halfwaardetijd van 3-HB onbekend. Na het uitvoeren van de experimenten kan de 3-HB halfwaardetijd worden berekend. Het hergebruiken van dieren uit experiment A is daarom niet mogelijk omdat het kan leiden tot incorrecte interpretatie van de resultaten. Het gebruik van een Latijns vierkant zou eventueel wel mogelijk worden door van tevoren de 3-HB halfwaardetijd te bepalen (waarvoor tenminste de hierboven genoemde 9 extra dieren nodig zijn). Echter hebben wij hier zoals eerder benoemd na zorgvuldige overwegingen van afgezien.

2. In ons laboratorium wordt algeheel een power van 0,9 gehanteerd. Aangezien het hier een nieuw model betreft, zal pas na de eerste studies duidelijk worden of er eventueel met een lagere power gewerkt kan worden en of er toch compensatie nodig is voor mogelijke uitval. Na experiment A zal een nieuwe poweranalyse worden uitgevoerd gebaseerd op de variatie coëfficiënt en effect size uit de verkregen resultaten met een eventueel aangepaste power om te kijken of het aantal dieren per groep moet worden aangepast.

Betreffende alinea projectbijlage 2.A – oud

*Therefore, 288 rats in total will be included in this experiment. No additional rats will be enrolled as no drop-out due to the short duration of the experiments is expected. After experiment A, a new power analysis will be performed based on the VC and effect size in this experiment to evaluate whether the number of animals per group in experiment B & C should be adapted.*

Betreffende alinea projectbijlage 2.A – nieuw

*Therefore, 288 rats in total will be included in this experiment. No additional rats will be enrolled as no drop-out due to the short duration of the experiments is expected. After experiment A, a new power analysis will be performed based on the VC and effect size in this experiment and possibly an adapted power to evaluate whether the number of animals per group in experiment B & C should be adapted.*

3. Hoewel het ratten model voor MADD middels dieet geïnduceerde riboflavine deficiëntie wel de biochemische en metabole status van MADD patiënten nabootst veroorzaakt door een verminderde vetzuuroxidatie activiteit, tonen de ratten geen ernstige (neonatale) ziektesymptomen vergelijkbaar met de symptomen van ernstig aangedane MADD patiënten. Een genetisch gemodificeerd MADD model in ratten bestaat niet. Aangezien we geïnteresseerd zijn in het werkingsmechanisme van 3-HB suppletie en niet de therapeutische effecten ervan, kan dieet geïnduceerde riboflavine deficiëntie als een alternatief rattenmodel voor MADD worden gebruikt om te onderzoeken of de activiteit van het metabolisme de uitkomstparameters beïnvloeden.

4. Een EGRAC status van  $\geq 1,3$  wordt aangehouden als afkappunt voor riboflavine deficiëntie en dus een valide ratten model voor MADD. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7e editie]

Betreffende alinea projectvoorstel 3.4.3 - oud

*The experiments in the MADD rat model will only be performed after completion of the experiments in healthy rats. A go/no-go criteria for the start of the experiments in the MADD rat model is confirmation of dietary induced riboflavin deficiency through the activation coefficient of erythrocyte glutathione*



*reductase (EGRAC) [Prentice 1981, Olpin 1982]. An EGRAC status of  $\geq 1.3$  will be considered as proven riboflavin deficiency. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7e edition]*

*If at any point during the experiments, administration of 3-HB to the rats is proven to be toxic and results in death of the animal or non-acceptable side effects, possible causes will be investigated thoroughly. The causative factor (for example high 3-HB dose) will be excluded from all subsequent experiments. Only if the 3-HB supplementation is well tolerated by the animals, the experiment will be continued with the next step.*

Betreffende alinea projectvoorstel 3.4.3 - nieuw

*The experiments in the MADD rat model will only be performed after completion of the experiments in healthy rats. A go/no-go criteria for the start of the experiments in the MADD rat model is confirmation of dietary induced riboflavin deficiency through the activation coefficient of erythrocyte glutathione reductase (EGRAC) [Prentice 1981, Olpin 1982]. An EGRAC status of  $\geq 1.3$  will be considered as proven riboflavin deficiency. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7e edition]*

*If at any point during the experiments, administration of 3-HB to the rats or the dietary inducement of riboflavin deficiency is proven to be toxic or harmful and results in death of the animal or non-acceptable side effects, possible causes will be investigated thoroughly. The causative factor (for example high 3-HB dose) will be excluded from all subsequent experiments. Only if the 3-HB supplementation is well tolerated by the animals, the experiment will be continued with the next step.*

Betreffende alinea projectbijlage 2.D – oud

*The animals included in the MADD model will receive a riboflavin deficient diet prior to the start and throughout the experiment. The biochemical status of riboflavin deficiency will be achieved within approximately six weeks. [Prentice 1981, Olpin 1982, Liao 1987, Ross 1987, Patterson 1988] This will be confirmed by analysis of the activation coefficient of erythrocyte GR (EGRAC) in washed erythrocyte preparations [Prentice 1981, Olpin 1982] isolated from a control blood sample (200  $\mu$ L) collected one to two days before the start of the experiment in order to allow for sufficient recovery time from this blood draw. Other relevant metabolites which can be used to improve characterization of the model will also be measured such as acylcarnitines, organic acids, amino acids, acetoacetate, lactate and electrolytes.*

Betreffende alinea projectbijlage 2.D – nieuw

*The animals included in the MADD model will receive a riboflavin deficient diet prior to the start and throughout the experiment. The biochemical status of riboflavin deficiency will be achieved within approximately six weeks. [Prentice 1981, Olpin 1982, Liao 1987, Ross 1987, Patterson 1988] This will be confirmed by analysis of the activation coefficient of erythrocyte glutathione reductase (EGRAC) in washed erythrocyte preparations [Prentice 1981, Olpin 1982] isolated from a control blood sample (200  $\mu$ L) collected one to two days before the start of the experiment in order to allow for sufficient recovery time from this blood draw. An EGRAC status of  $\geq 1.3$  will be considered as proven riboflavin deficiency. [Prentice 1981, Mulherin 1996, Advanced Nutrition and Human Metabolism, 7e edition] Other relevant metabolites which can be used to improve characterization of the model will also be measured such as acylcarnitines, organic acids, amino acids, acetoacetate, lactate and elektrolytes.*

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

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

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

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*

**JA**



2. De aanvraag betreft **een nieuwe aanvraag**
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

**JA**

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.

**NEE**

## **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 concrete doelstellingen en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC vertrouwt erop 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 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).

**Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RUG signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.**

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

**De doel categorieën sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.**

*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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

**Het directe doel is om om meer inzicht te krijgen in mogelijkheden van 3-HB supplementatie door de werkzaamheid van verschillende mixen van 3-HB te onderzoeken, dit met specifieke aandacht voor farmacokinetische parameters en werkingsmechanismen.**

**Het uiteindelijke doel is om 3-HB supplementatie meer bij MADD-patiënten toe te (kunnen) passen als wel mogelijk ook bij patiënten met een andere 'inborn error of metabolisme' tesamen met een klinische presentatie veroorzaakt door de energie metabolisme deficiëntie.**

**Er is deels een directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel: 3-HB zal toegepast kunnen worden bij mensen. Het project betreft een fundamenteel en translationeel onderzoek m.b.t. het hiervoor beschreven directe doel; het uiteindelijke doel zal binnen de looptijd van het project naar alle waarschijnlijkheid niet gehaald worden. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.**

**De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.**

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 proefdieren en patiënten met 'inborn error of metabolisme' tesamen met een klinische presentatie veroorzaakt door de energie metabolisme deficiëntie.**

**Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan.**

**Waarden die voor patiënten bevorderd kunnen worden: de 3-HB supplementatie zou een belangrijke behandeling kunnen vormen om energie balans herstel bij patiënten te bevorderen.**

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

**Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RUG signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.**

*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. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

**Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat** [REDACTED]

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. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).*

**De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstellingen in het kader van het project.**

*Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **NVT**
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. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

**De aanvragers hebben aangegeven dat er afgeweken wordt van de eisen conform bijlage III van richtlijn 2010/63/EU: de dieren in de 'MADD rat model group' zullen voor en gedurende het experiment een riboflavine deficiënt dieet krijgen. De aanvragers hebben de noodzaak hiervoor in voldoende mate onderbouwd.**

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

**Dit lijkt realistisch ingeschat. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen**

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. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

**De integriteit van de dier wordt aangetast door narcose, herhaalde bloedmonstername, gavage en het verstrekken van een riboflavine-deficiënt rantsoen en opoffering.**

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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

**Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig**

## **aangegeven in de projectaanvraag**

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

**De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De farmacokinetiek en weefselverdeling van 3-HB is niet na te bootsen in vitro.**

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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

**Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat, zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties.**

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. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

**De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Dit blijkt bijvoorbeeld uit het feit dat de aanvrager de status van vetzuuroxidatie gaat monitoren.**

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.

**Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.**

*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. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

**In de onderhavige projectaanvraag worden mannelijke dieren gebruikt. Dit is voldoende beargumenteerd door de aanvrager.**

**Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden**

**daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.**

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, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

**Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager. Dieren worden gedood in het kader van de proef (gebruik weefsels, etc.).**

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. **NVT**

*NTS*

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

**Naar de mening van de DEC is zulks het geval.**

**D. Ethische afweging.**

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "**Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedingssupplement 3-HB**", dat gericht is op de verbetering van de behandelmethoden van de ziekte MADD en daarmee de vergroting van de kans op herstel bij dergelijke patiënten het gebruik van ratten in een experiment met licht-matig ongerief in de onderhavige aanvraag?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **licht-matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **mogelijk reëel voordeel.**

Algemeen: **vergroting van medische kennis met betrekking tot de behandeling van MADD. Dit kan op termijn leiden tot een verbeterde levensverwachting bij patiënten met deze chronische ziekte.**

De DEC-RUG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "**Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedingssupplement 3-HB**" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven in een experiment tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun levensduur geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden voorafgaand aan de narcose op basis van herhaalde meting lichaamsgewicht en bloedmonstername, gavage en het verstrekken van een riboflavine-deficiënt rantsoen.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het behandelen van MADD als chronische ziekte. Voor de betreffende patiënten is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op herstel van groot belang. Dit verhoogt hun levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven. Tevens zal de kwaliteit van leven van hun naasten verbeterd worden.

Vandaar dat de DEC-RUG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk, translationeel als vanuit maatschappelijk oogpunt, van belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

De DEC-RUG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project "**Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedingssupplement 3-HB**", dat gericht is op de verbetering van de behandeling van MADD, in relatie tot de opoffering van de dieren in het voorliggende project bevestigend.

Hoewel de DEC-RUG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het belang van dit project naar haar mening zwaarder. De DEC-RUG is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie. In de gekozen strategie wordt op voldoende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-RUG is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RUG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RUG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "**Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedingssupplement 3-HB**" als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RUG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

**De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarde:**

- **Dat een 'activation coefficient of erythrocyte glutathione reductase' (EGRAC) waarde bij de riboflavine-deficiënte dieren onder de 1.3 (\*) wordt beschouwd als een 'no go' moment.**

*(\*) De EGRAC waarde is de ratio van flavin-adenine dinucleotide (FAD)-gestimuleerde enzym activiteit in verhouding tot de niet gestimuleerde enzym activiteit: het geeft de riboflavine status aan. Een EGRAC status van  $\geq 1.3$  wordt gezien als een bewezen riboflavine deficiëntie.*

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

**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*).

**N.v.t. De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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




**Bijlagen**

2

Datum 22 juni 2017  
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 20 juni 2017. Het gaat om uw project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is . Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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



**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**

22 juni 2017

**Aanvraagnummer:**

████████████████████

**Datum:**  
22 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
[REDACTED]

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: [REDACTED]  
Naam instelling of organisatie: [REDACTED]  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: [REDACTED]  
Straat en huisnummer: [REDACTED]  
Postcode en plaats: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
22 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
[REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?  Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 september 2017  
Geplande einddatum: 1 september 2022  
Titel project: Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de behandeling van de stofwisselingsziekte MADD met het voedingssupplement 3-HB  
Naam DEC: [REDACTED]  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1035,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

[Redacted]

**Datum:**

22 juni 2017

**Aanvraagnummer:**

[Redacted]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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

**Bijlagen**

2

Datum 22 juni 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 22 juni 2017  
Vervaldatum: 22 juli 2017  
Factuurnummer: 172265

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1050020172265	€ 1035,-

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.

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 24 augustus 2017 11:14  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** FW: aanvraag [REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 11 juli 2017 16:38  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** aanvraag [REDACTED]

Geachte [REDACTED]  
Op 20 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" met aanvraagnummer [REDACTED]

U vraagt een vergunning aan met een looptijd van 5 jaar voor een beperkt aantal experimenten. Zou u een meer reële looptijd kunnen aangeven en hiervoor een nieuw aanvraagformulier in kunnen dienen?

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
Medewerker behandelen en ontwikkelen  
Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**  
**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)**

[Redacted]

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 24 augustus 2017 11:13  
**Aan:** [Redacted]  
**Onderwerp:** FW: aanvraag [Redacted]

---

**Van:** [Redacted]  
**Verzonden:** dinsdag 18 juli 2017 21:41  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** RE: aanvraag [Redacted]

Geachte heer/mevrouw,

Op 11 juli 2017 jongstleden ontvingen wij van u onderstaande vraag over onze projectaanvraag getiteld "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" (aanvraagnummer [Redacted]). Deze vraag heeft betrekking tot de geplande looptijd van het project.

Tijdens telefonisch contact met [Redacted] heb ik vanmiddag afgesproken dat wij de voorgestelde looptijd van 5 jaar per e-mail zouden toelichten.

[Redacted]

Ik hoop de voorgestelde looptijd hiermee voldoende te hebben toegelicht. We staan uiteraard tot uw beschikking voor het beantwoorden van eventuele aanvullende vragen.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

[Redacted]

Phone: [redacted]  
Fax: [redacted]  
E-mail: [redacted]  
URL: [redacted]

---

**Van:** [redacted]  
**Verzonden:** donderdag 13 juli 2017 10:17  
**Aan:** [redacted]  
**Onderwerp:** FW: aanvraag [redacted]

From: **Info-zbo** <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>

Date: 2017-07-11 16:38 GMT+02:00  
Subject: aanvraag [redacted]  
To: [redacted]  
Cc: [redacted]

Geachte [redacted]  
Op 20 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" met aanvraagnummer [redacted]

U vraagt een vergunning aan met een looptijd van 5 jaar voor een beperkt aantal experimenten. Zou u een meer reële looptijd kunnen aangeven en hiervoor een nieuw aanvraagformulier in kunnen dienen?

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

[redacted]  
Medewerker behandelen en ontwikkelen  
Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

--  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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  
[Redacted]  
**Bijlagen**  
1

Datum 20 juli 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 20 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium-D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" met aanvraagnummer [Redacted]. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 18 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u de benodigde looptijd voor het project onderbouwd.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

In uw aanvraag wordt niet gesproken over kinetisch modelleren, de mogelijkheid hiervoor in dit specifieke geval is mogelijk niet eenvoudig. Wij willen uw aandacht vragen om de in dit project gemeten resultaten in de toekomst te gebruiken voor kinetische modelleringen.

U kunt met uw project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium- D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022. Deze termijn is anders dan in uw

aanvraag, omdat een vergunning een maximale looptijd van 5 jaar kan hebben.

**Datum:**  
20 juli 2017  
**Aanvraagnummer:**  
[REDACTED]

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RuG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 20 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij niet geheel over.

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

#### **Bezwaar**

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Algemeen Secretaris

**Datum:**  
20 juli 2017  
**Aanvraagnummer:**  
[Redacted]

**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Gaining insight in pharmacokinetic parameters and mechanisms-of-action of sodium-D,L-3-hydroxybutyrate (3-HB) treatment in Multiple Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency (MADD): experimental studies in rats" met aanvraagnummer [REDACTED], volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RuG. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. De door de DEC gestelde voorwaarde wordt niet overgenomen, daar deze handelswijze al in de projectaanvraag beschreven staat. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 20 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 juni 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 juni 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 20 juni 2017, ontvangen op 20 juni 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 18 juli 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Pharmacokinetics parameters and 3-HB deposition in organ tissues after supplementation of various 3-HB mixtures</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Wistar	288	50% Matig 50% Licht	

## 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.

**Aanvraagnummer:**



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:  
[REDACTED]

## 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:**



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

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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

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