

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2017807	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Project proposal			x						
4	bijlage animal procedure 1			x						
5	bijlage animal procedure 2			x						
6	bijlage animal procedure 2			x						
7	DEC advies				x		x	x		
8	Advies CCD aan bestuur		x						x	
9	Beschikking				x		x	x		



06 JAN 2017

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700
 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	Universiteit Maastricht	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	
KvK-nummer	50169181	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6
Postbus	616	
Postcode en plaats	6200 MD	Maastricht
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht	

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.

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 01 - 2017
- Einddatum 30 - 12 - 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Imaging of brown adipose tissue metabolism
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Beeldvorming van bruin vet
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-UM
- Postadres Postbus 616, 6200 MD Maastricht
- E-mailadres [REDACTED]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 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	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Maastricht
Datum	2 - 1 - 2017
Handtekening	[REDACTED]



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).
- 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.

Throughout the 1980s, several research groups and pharmaceutical companies attempted to use the potential of thermogenic pharmaceuticals to influence weight loss [1]. Although the presence of brown adipose tissue in adult humans was at that time unknown (in fact most researchers actually suspected BAT to be probably absent in humans), the idea remained to treat adipose and/or muscular tissue,

stimulating thermogenesis, in an effort to combat obesity [2,3]. As of 2009, when the presence and metabolic activity (in terms of glucose utilisation) of brown adipose tissue in adult humans was clearly and specifically demonstrated using [18F]-FDG PET, interest rose again [4-6]. A correlation between BAT activity and age as well as Body mass index was found in 2009, which makes it a very interesting target in the fight against obesity and other diseases [7,8]. It now seemed possible to further research combating obesity (and its related diseases such as diabetes and atherosclerosis) by specifically targeting brown adipose tissue. This possibility requires extensive knowledge about human brown adipose tissue however, which is no easy feature.

The best option to study human BAT is to visualise the metabolic processes within brown adipose tissue non-invasively, allowing us to understand these processes (such as lipid metabolism) without dissecting organs. This quantification allows to answer the following questions:

- On a fundamental level: what is the role of brown adipose tissue in humans? Is it similar to that of small mammals, functioning as a primarily thermogenic organ, or does it have other functions?
- On an epidemiological level: is brown adipose tissue involved in (human) diseases, such as obesity or diabetes? Is the (published) correlation between obesity and absence of brown adipose tissue appearance on FDG scans a true causal correlation?
- On a disease level: is it possible to specifically stimulate brown adipose tissue in such a way so it can help fighting a particular disease (such as diabetes)?

These questions then bring us to the core of this request, namely the development of new radiopharmaceuticals to visualise brown adipose tissue metabolic processes. Currently, there is a very limited number of radiopharmaceuticals that are able to quantify brown adipose tissue metabolic processes. The main tracer currently available, with a reasonable valorisation regarding brown adipose tissue uptake, is [18F]-FDG. This tracer is a glucose analogue, capable of visualising and quantifying glucose uptake in metabolically active tissue. It is however unclear to what extent this tracer reflects lipid burning (if there even is a close correlation), so the tracer cannot be used for quantification purposes. There are a number of other possibilities that can visualise BAT, listed below. These tracers have been investigated both by our own group and by other groups [9,10]. None of these tracers are currently considered as sufficient to quantify BAT metabolic activity.

- Radiolabeled oxygen: well suited for quantifying lipid burning, but with extremely limited availability so not applicable in most centres [11]
- Radiolabeled fatty acids: well suited for quantifying Non-Esterified Fatty Acid (NEFA) uptake (which is correlated to lipid burning), but needs CT or MRI to quantify/estimate intracellular lipid utilisation
- Radiolabelled MIBG: shows adrenergic beta-receptor density, but (causal) correlation to BAT activity in terms of lipid burning quantification yet to be determined
- Radiolabelled water, Thalliumchloride, albumine: these tracers show the varying degree of blood pool present in tissue, which directly and indirectly affects tissue metabolic activity

In this proposal, we aim to develop a series of new radiopharmaceuticals, usable both in preclinical and clinical settings, that do allow to quantify BAT metabolic activity. These new tracers are derived from different classes of radiolabeled compounds: triglycerides (free or in the form of lipoproteins), apolipoproteins, triphenylphosphoniums (visualising mitochondrial membrane voltage) or other small organic compounds.

The initial development of these compounds is inherently chemical in nature, and does not require animal testing in the early phases of the study. However, subsequent tracer validation does require the use of both in vitro and in vivo models. When in vitro experiments are positive, the in vivo experiments are performed by imaging experiments, where each tracer is injected intravenously, after which imaging and quantification parameters are evaluated. We propose to use several different in vivo models:

- Healthy rodents (mice): these serve as a first and fast in vivo screening of newly developed tracers, requiring only a small amount of animals per compound. They allow to evaluate tracer plasma and tissue stability, biodistribution and pharmacokinetics. We estimate that 15 or less tracers will reach this stage, from which no more than 5 will be selected, based upon the results from the screening experiments as detailed in appendix 1, for further research into disease models.
- Diabetes/obesity mice models: these are more advanced models, that allow to establish if the tracers can quantify disease-related metabolic and/or volumetric changes in BAT, as BAT activity has previously been shown to correlate inversely with BMI and diabetes status [12, 13]. Although diabetes and obesity are linked to each other, the underlying cause of the disease (either a

(pharmacologically induced) reduction of pancreatic islets functionality or a high-fat diet induced obesity) is different, requiring us to test both models in order to validate if a tracer can measure the disease-related change in BAT activity.

- Atherosclerosis models: both interscapular BAT as well as perivascular BAT have a profound effect on the development of atherosclerosis: activated BAT significantly lowers plasma lipid concentrations and prevents the development of plaques [14,15]. We want to study to what extent our newly developed tracers have an uptake in interscapular BAT and perivascular BAT in this model, but at the same time also evaluate if our tracers are accumulating in the atherosclerotic plaques.

At the end of our study, we aim to have a limited set of new tracers that can visualise and quantify metabolic aspects of BAT in vivo. Although our study is currently in animal models, each developed tracer is in principle also suitable for human applications, as the imaging techniques to visualise tracer uptake are nearly identical in humans and rodents. As such, we hope to bring successful tracers in this study into future clinical trials with healthy subjects, but also diabetes, obesity or atherosclerosis patients. After all, the overall goal is not to develop compound to produce nice images of BAT activity, but to use the quantitative information we obtain from the images in order to understand changes in BAT activity caused by a treatment or a disease, allowing for better first-stage diagnosis and treatment planning.

References:

- [1] Stewart IC et al. Pharmacological approaches to the regulation of fat metabolism. *Bibl Nutr Dieta*. 1986;(39):16-26.
- [2] Tremblay A. Human obesity: a defect in lipid oxidation or in thermogenesis? *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1992 Dec;16(12):953-7
- [3] Yen TT. Antiobesity and antidiabetic beta-agonists: lessons learned and questions to be answered. *Obes Res*. 1994 Sep;2(5):472-80
- [4] Cypess AM, L. S. et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans . *N Engl J Med* 2009, 360, 1509-1517.
- [5] van Marken Lichtenbelt WD, V. J. et al. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men . *N Engl J Med* 2009, 360, 1500-15008.
- [6] Virtanen KA, et al. *N Engl J Med*. 2009;360:1518-25.
- [7] Cypess AM, L. S. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans . *N Engl J Med* , 360, 1509-1517.
- [8] van Marken Lichtenbelt WD, V. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men . *N Engl J Med* , 360, 1500-15008.
- [9] Bauwens M, et al. Molecular imaging of brown adipose tissue in health and disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014 Apr;41(4):776-91.
- [10] Vijgen G, et al. Brown adipose tissue: clinical impact of a re-discovered thermogenic organ. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jun 1;5:823-33
- [11] Miller PW, et al. Synthesis of ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, and ¹³N radiolabels for positron emission tomography. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008;47(47):8998-9033.
- [12] Kajimura S, et al. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab*. 2015 Oct 6;22(4):546-59.
- [13] Bartelt A, et al. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Jan;10(1):24-36.
- [14] Chang L, et al. Paradoxical roles of perivascular adipose tissue in atherosclerosis and hypertension. *Circ J*. 2013;77(1):11-8.
- [15] Geach T. Dyslipidaemia: Active BAT reduces atherosclerosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Jun;11(6):317.

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 primary goal of this project is the development of new radiopharmaceuticals that are able to

visualise BAT and quantify its metabolic processes. Our research is restricted to this development and does not extend into fundamental research into the metabolism of BAT itself. For this purpose, we choose *in vivo* imaging experiments, using healthy mice as well as disease models. As we focus on different metabolic processes, multiple candidate tracers will enter our study. We focus on the imaging of lipid metabolism and on the mitochondrial membrane voltage.

The main question for each tracer is: "Does the tracer allow to quantitatively determine the metabolic process it exemplifies *in vivo*?"

This study has a strong background, but an inherent scientific risk due to the unknown behaviour of new compounds *in vivo*. Maastricht has a strong background in handling healthy animals as well as the disease models we intend to use.

Bibliography

[1] Madar I, I. T. (2011). 18F-fluorobenzyl triphenylphosphonium: a noninvasive sensor of brown adipose tissue thermogenesis. *J Nucl Med*, 52, 808-814.

[1] Tewson TJ, W. M. (1978). [18F]-labeled 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose: synthesis and preliminary biodistribution data. *J Nucl Med.*, 19, 1339-1345.

[2] P. Padmini S. J. Khedoe, G. H. (2015). Brown adipose tissue takes up plasma triglycerides mostly after lipolysis. *Journal of Lipid Research*, 56, 51-59.

[3] Antar MA. (1990). Radiopharmaceuticals for studying cardiac metabolism. *Int J Rad Appl Instrum B*, 17, 103-128.

[4] DeGrado TR, C. H. (1991). 14(R,S)-[18F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid (FTHA): evaluation in mouse of a new probe of myocardial utilization of long chain fatty acids. *J Nucl Med.*, 32, 1888-1896.

3.3 Relevance

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

Scientifically: considering the research into the field of BAT (and lipid metabolism in general) in laboratory animals throughout the world, there is a need for non-invasive imaging techniques that allow longitudinal studies about metabolic activity of BAT. The study we propose will deliver a number of radiopharmaceuticals, suitable for this task. Once fully developed and implemented, this will result in better studies, but also the use of fewer animals.

Socially: The object of this study is to generate tracers that are able to quantify a number of metabolic parameters in BAT. Due to the nature of these tracers (radiopharmaceuticals), these tracers can also be applied in humans once animal experiments proved successful. In these human studies, information can be gathered about BAT, in relation to diseases such as obesity, diabetes and atherosclerosis. This may lead to diagnostic applications (by means of comparing non-invasive imaging parameters in healthy and diseased subjects), or even new therapeutic applications (by the newly gathered information).

3.4 Research strategy

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

After successful radiosynthesis of our imaging agents, the agents are tested *in vitro* to prove their specific binding to the target tissue as well as their blood stability. After successful *in vitro* characterization, each tracer (maximum 15 in total) should be tested in a first screening model with healthy mice to evaluate its *in vivo* characteristics. A favourable high specific uptake in BAT as well as a fast clearance in other organs is extremely important for the further applications and the ongoing animal experiments, and form a go/no-go decision point. In the case of a successful screening, further animal experiments with different models will be planned to investigate the following diseases: **Lipid dysregulations** (including diabetes/obesity) and atherosclerosis. These models, with previously described alteration of BAT metabolic activity, will serve to further validate the tracers and confirm their

applicability in disease models.

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.

Screening pharmacokinetics and biodistribution:

For the first tracer application *in vivo* a screening is necessary to be evaluate the *in vivo* behaviour and pharmacokinetics of the compound. Therefore the tracer is injected into the animal under anaesthesia and after a certain circulation time, which needs to be determined and could differ for each compound, the animal is again anesthetized and scanned under anaesthesia. At the end of the imaging experiment, the animal is euthanized after the scan, dissected and a biodistribution is performed.

Lipid disregulations:

Tracers (maximum 5 in total) which showed suitable uptake for brown adipose tissue in the screening scans are used for this type of animal model. Healthy mice, diabetic mice (pharmacologically induced) and obese mice are used to visualize BAT under these conditions. For each type of mice the group is divided into three subgroups (non treated, diet, cold exposure), that each have a different effect on the metabolic activity of BAT. After the treatment, the mice are injected with the tracer and the imaging experiment itself is performed before they are dissected and a biodistribution is performed.

Atherosclerosis:

Successful BAT imaging tracers can play an important role in unraveling the complexity of the disturbed lipid metabolism seen in atherosclerosis. To investigate the potential of (maximum 5) BAT imaging tracers in the context of atherosclerosis several genetically altered mice (i.e. ApoE^{-/-}) will be subjected to carotid collar placement and/or Western type diet feeding. The primary goal is not to visualize the atherosclerotic plaque itself, but instead the interscapular and perivascular BAT in this model. The imaging experiment is similar to the **lipid disregulations** study: diet/environmental factors are applied first, after which the actual imaging experiments take place.

A combination of dedicated small animal molecular imaging techniques (e.g. SPECT, PET,CT and MRI) at our facility guarantees highly specific and sensitive imaging.

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.

Before any research using animals is performed, all candidate tracers are evaluated in an in vitro model, using cells harvested from human BAT.

The first in vivo component is again a screening of the tracers, which should give an idea about the behaviour of the compound *in vivo* and is essential to decide whether a compound can be used for further procedures or not. If a compound shows good pharmacokinetics in screening, it is suitable for imaging in disease models (**Lipid disregulations**, atherosclerosis). If a compound fails at this stage, e.g. due to a unfavourable biodistribution, too slow/fast pharmacokinetics or poor in vivo stability, it is not worth going to additional animal experiments, unless the compound is modified for better pharmacokinetics.

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	Screening pharmacokinetics and biodistribution
2	Lipid disregulations
3	Atherosclerosis
4	
5	
6	
7	
8	

9	
10	



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).
- 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'.	10700	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	University Maastricht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Screening pharmacokinetics and biodistribution

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.

This experimental approach makes use of healthy mice that are subjected to the imaging study for a maximum of 24 hours. All tracers are injected intravenously and scanned immediately after injection and, if required, again scanned at later time points. After this imaging study, mice are killed and a biodistribution study is performed. In total, we aim to test (maximum) 15 different tracers. This amount is based upon previous experience in producing new radiopharmaceuticals.

We require 4 groups of mice per tracer:

- Group 1: evaluation of plasma stability and blood clearance: these are both go/no-go parameters for every tracer, as in case of insufficient plasma stability or inadequate blood clearance, further in vivo studies are not warranted. Additionally they provide initial information on ideal imaging time points and initial biodistribution data.
- Group 2: evaluation of biodistribution over time: this experiment allows us to determine ideal imaging time points with more detail (anywhere between 5 minutes p.i. and 24 hours p.i.). Failure to obtain qualitative images in the first 24 hours is considered to be failure of the compound and a no-go.
- Group 3: In this group we study, at the correct time point, the biodistribution of the tracer in vivo in more detail (and including a dissection/biodistribution study). Tracer uptake in BAT, and BAT/background ratios are key parameters.
- Group 4: this group does not receive any tracer, but only serves to allow histochemical/PCR validations if needed, as these validations usually cannot be performed on radioactive tissue obtained from the first 3 groups. These validations are absolutely necessary to validate the findings we make in group 1-3, as they provide evidence for the presence, quantity and location of the targets that the tracers are assumed to bind with in vivo.

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

The animals undergo imaging experiments, including the i.v. injection of a tracer and 1-3 imaging experiments (depending on mouse group and clearance kinetics) within 24 hours p.i.. Blood samples will be drawn periodically (according to nc3rs guidelines). Imaging is performed under anaesthesia, and all animals are sacrificed at the end of the experiment by anaesthesia overdose.

"Imaging" is either PET or SPECT imaging, combined with anatomical imaging using CT or MRI.

These proposed experiments are necessary to study pharmacokinetics, biodistribution and in vivo stability of each tracer under investigation. By quickly using imaging to evaluate our tracers instead of blunt dissections at different time points, we cause a minor additional discomfort to the animals (due to the sedated imaging procedure), but we vastly reduce the amount of animals needed in the study.

Time (h)	0	0-1	1	medium time	late time	24
Group						
1 (*)	Tracer injection	Blood sampling.	Sacrifice. Plasma analysis.	-	-	-
2 (**)	Tracer injection	Imaging		Imaging	Imaging	Sacrifice.
		Time point according to results from group 2.				
3	Tracer injection	Imaging, followed by sacrifice/biodistribution/dissection/ex vivo analysis.				-
4	Tracer injection	Sacrifice/tissue analysis (PCR, immunohistochemical,...)				-

(*): if tracer is unstable in vivo, further in vivo experiments are not performed with this tracer.

(**): if no adequate images can be obtained in this group, further in vivo experiments are not performed with this tracer.

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

Calculation of group sizes will be done using the formula of L. Sachs.

As this is the screening group several questions need to be answered, which are grouped together as much as possible to reduce the number of animals required (yielding 4 main questions and animal groups, see above).

B. The animals

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

Wild type C57Bl/6J female mice will be used. Animals will be ordered from a licensed breeder. We plan to use 6 animals per group, which is sufficient to take into account any variation in the measured parameters. We thus have 6 animals per group, multiplied by 4 question groups, multiplied by 15 tracers: $6 \times 4 \times 15 = 360$ animals. The life stage at which we would like to initiate our studies will typically be at the age of 8 to 10 weeks. This relatively young age is chosen because BAT has been shown to diminish as animals grow older. Mice species are chosen based upon previous experience and extensive available literature, and there are clear links showing that healthy mice are representative for imaging experiments in other mouse models. The sex of the mice is chosen to be female in order to maximise standardisation (some of the groups in appendix 2 and 3 need to be females in order to reduce discomfort).

In total, we expect to use 360 mice to investigate our objectives within this part of the project.

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:

The synthesized compound is tested e.g. for its binding ability in an *ex vivo* or *in vitro* binding study. Blood stability is tested *ex vivo* as well. By those measures, compounds with inappropriate characteristics can be excluded before they are tested in animals and the number can be kept reasonable low.

Reduction:

The total amount of animals used for this study is kept as small as possible by applying different *in vitro* experiments before injecting into an animal. Furthermore, the minimal necessary amount of animals has been statistically determined by the method of L.Sachs.

Refinement:

The procedure is kept as easy and comfortable as possible for the animals. The injection as well as the scan is performed under anaesthesia, but animals are allowed to wake up and roam freely in their cage inbetween scans.

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

The experiment is set up in such a way as to minimize animal suffering or pain, by applying anaesthetics and/or analgesics whenever necessary. Protocols for administration of analgesics will be strictly followed in order to reduce unnecessary suffering and pain.

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.

Not applicable.

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

No

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

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.

All animals undergoing an imaging experiment will be sedated during the entire procedure using appropriate anaesthesia. Besides of an injection in the tail vein, no pain is expected.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

As radioactive markers are tested we do not expect any toxicity due to the small amount (nM range) which is applied. However, if unexpectedly toxic effects are observed, a reduction of the injected amount with respect to the image quality can be applied. If there are still harming effects for the animal, the tracer is excluded from the studies.

In general, the amount of tracer is determined by limitations on image quality, tracer distribution, tracer specific activity, radiation protection and toxicity. These limitations will be made clear in the standard operating protocols.

Explain why these effects may emerge.

During our screening experiments no data about toxicity of compounds are available.

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

Animals are monitored during injection. If any complications can be observed, injection of the tracer is stopped.

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.

Toxic side-effects of the tracer within 24 hours p.i. are unlikely within our dose range but not completely impossible. In such a case, when clear animal pain or other serious discomfort is noted, the animal is killed.

Indicate the likely incidence.

Less than 1%.

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').

Intravenous injection of tracers under anaesthesia before scanning (maximum once per animal, in total 360 events): mild

Scans (SPECT, PET, CT, MRI) under anaesthesia, with or without recovery (0 times per animal in group 1, 3 times in group 2, 1 time in group 3, 0 times in group 4 – in total 360 times): mild

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.

The animal needs to be killed to obtain detailed information that cannot be gained from the imaging study, such as detailed biodistribution, immunohistochemistry and intra-tissue stability.

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



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).
- 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'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	University Maastricht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure <i>Lipid disregulations</i>

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.

Animals are scanned for BAT with pre-evaluated tracers from the screening experiment under 3 different environmental conditions (room temperature, acute cold exposure and cold acclimatization) and with 3 different disease status (non treated, obese, diabetic), resulting in 9 different groups. In each group, every tracer is evaluated for its uptake in BAT and BAT to background ratio. Additionally, biodistribution studies will show tracer distribution over the remainder of the body and may yield more detailed findings in other lipid-related organs such as liver and WAT.

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

Animals are first divided into three groups (control, obese, diabetic). Mice receive a chow diet (control, diabetes groups) or a high fat diet (obese group) for 16 weeks (ref 1,2). In the diabetes group, diabetes is induced pharmaceutically by streptozotocin at the end of this period (ref 3). After streptozotocin administration, blood samples are taken to check glucose levels (according to nc3rs guidelines). One week post administration, the imaging experiment is performed. This results in fully developed diabetes in the mouse strains we aim to use, but not yet with severe disease status.

All three groups are subdivided into three groups with varying environmental factors (no cold exposure, short cold exposure, cold acclimatization – ref 1) (see Table 1), in order to study the effect of BAT activity by combined diet- and temperature-mediated stimulation. Cold exposure results in an increase of BAT metabolic activity, while cold acclimatization results in an increase in both activity as well as overall proliferation and volume of BAT.

The no cold exposure group is injected with the tracer immediately after its control/diet/diabetes induction. The mice exposed acutely to cold are housed one week prior to the experiment at an

environmental temperature of 21°C. After that they are exposed to an ambient temperature of 6°C for 4 h, prior to tracer injection. The last group (cold acclimatization) is exposed to 6°C for 1 month for 6 hours per day, and afterwards introduced in the actual imaging experiment. As those experiments should show BAT activation due to cold exposure and cold acclimatization, exposure of the animals to cold is necessary.

After the described treatment the compound is injected into anesthetized mice, which are scanned afterwards with PET or SPECT depending on the used isotope for a reasonable amount of time (as determined in appendix 1). After the scan the animal is euthanized by an overdose of anaesthesia, dissected and a biodistribution is performed (secondary read-out parameter, after PET/SPECT image analysis, allowing higher spatial resolution but no time resolution).

By performing these experiments, it is expected to gain information about tracer uptake in BAT in several conditions, including cold-activation and dependence on diabetes and obesity with respect to ground state and cold exposure. This is the only way to test tracer behavior *in vivo*.

The experiment from appendix 2 is, per tracer and if successful in C57Bl/6 mice, entirely repeated in ApoE^{-/-} mice as we expect the knock-out of ApoE^{-/-} to have an effect of lipid-uptake capacities of BAT, and that the induction of obesity and diabetes may effect this. (see table 1, ApoE^{-/-} mice are marked as subgroup "b") This applies only to the high fat diet group and the diabetic group, we will not repeat control experiments with the ApoE^{-/-} mice.

Table 1

Subgroups	Groups		
	Control	Obese (C57Bl/6 mice and ApoE ^{-/-} mice)	Diabetic (C57Bl/6 mice and ApoE ^{-/-} mice)
No cold exposure	1	4 a,b	7 a,b
Short cold exposure	2	5 a,b	8 a,b
Cold acclimatization	3	6 a,b	9 a,b

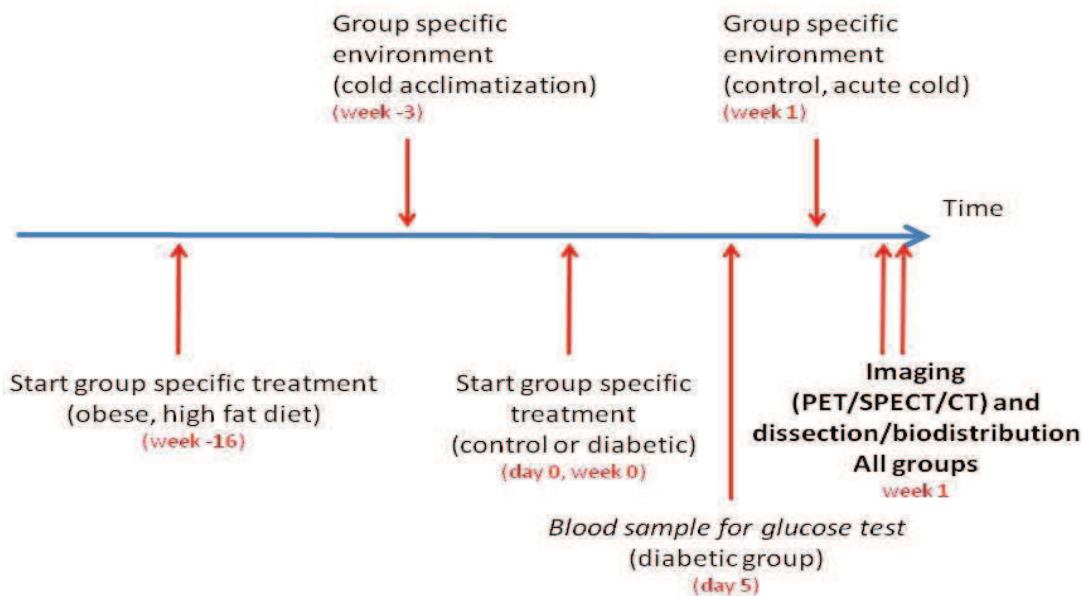


Table 2: Age of the mice at each stage in the experiment (in weeks)

Time according to timeline	week -16	week -3	day 0	week 1	day 5	(end of) week 1
Group						
Control	-	8-10	11-13	12-14	12-14	12-14
Obese	8-10	21-23	24-26	25-27	25-27	25-27
Diabetic	-	8-10	11-13	12-14	12-14	12-14

Reference 1: Brown adipose tissue: function and physiological significance. Cannon B, Nedergaard J. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):277-359.

Reference 2: An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. Heydemann A. *J Diabetes Res.* 2016;2016:2902351.

Reference 3: Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, Török S, Pósa A, Varga C. *J Diabetes Res.* 2016;2016:9051426

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

Calculation of group sizes will be done using the formula of L. Sachs, using statistical information provided by the in vivo screening experiment (appendix 1).

We expect to evaluate maximum 5 different tracers in this particular study, and the ApoE^{-/-} mice will only be used if successful data have been obtained in the C57Bl/6 strain.

B. The animals

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

ApoE^{-/-} mice will be used (C57Bl6 background) in addition to wild type C57Bl6 mice, as they respond differently do dietary and cold treatment conditions (Jong 2001). Although these mice have very similar BAT genetically, the lipid uptake mechanism in ApoE^{-/-} mice is different from that in C57Bl/6 as the ApoE-dependent uptake of lipids in lipoproteins is not possible here, resulting in either lower uptake or different uptake mechanisms (currently unknown).

Animals will be ordered from a licensed breeder. We expect to use 450 female mice to investigate our objectives within this part of the project (estimated 6 animals per group, 15 groups per tracer, 5 tracers).

The life stage at which we would like to initiate our studies will typically be at the age of 8 to 10 weeks. This relatively young age is chosen because BAT has been shown to diminish as animals grow older. Mice species are chosen based upon previous experience and literature (Jong 2001, Rensen 2014, et al.) The sex is chosen to be females as, especially in ApoE^{-/-} mice, male mice show skin lesions more frequently compared to females.

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:

The evaluation of tracer properties, with the long-term aim of human applications, is only possible in vivo. Although in vitro steps are useful for screening compounds for a number of characteristics (ex vivo stability, solubility, receptor binding kinetics), they cannot replace the necessary amount of data obtained from in vivo experiments (pharmacodynamics, biodistribution,...).

Reduction:

The total amount of animals used for this study is kept as small as possible by applying different *in vitro* experiments before injecting into an animal. The minimal necessary amount of animals has been statistically determined by the method of L.Sachs.

Refinement:

Any compound injection or imaging experiment is performed under anaesthesia. Euthanization is induced immediately after the scan whenever appropriate. In addition, the environmental changes (i.e. cold) take place with the mice still in their home cage, including cage enrichments and with group housing.

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

The condition of the animal will be monitored by animal caretakers of the CPV or one of the responsible investigators. During experiments, at least one of the researchers is present to observe the wellbeing of the animals. Protocols for administration of analgesics will be strictly followed in order to reduce unnecessary suffering and pain.

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.

Not applicable.

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.

One third of the animals (maximum 150 mice) is subjected to a "cold acclimation" protocol. In this protocol, the animals are housed at normal room temperature conditions and in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU (18 hours per day), but are also subjected to cold (4°C, 6 hours per day). This cold acclimation takes place in their home cage (including cage enrichment and in group) to improve comfort.

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.

All animals are sedated during the imaging experiment to minimise discomfort from tail vein injection and PET/SPECT imaging.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

By induction of diabetes toxic effects of streptozotocin to other organs, especially the liver, can be possible. Animals with diabetes are at risk for diabetes related complications (such as diabetic peripheral neuropathy), and animals exposed to long-term cold exposure have a higher risk of pulmonary infections.

Explain why these effects may emerge.

As a side effect of the induced disease or treatment.

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

Animals are monitored on a daily basis, and housing as well as caretaking is adapted to the environment/disease models. A welfare journal is kept for every animal, which is checked daily.

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.

An animal will be euthanized once it experiences more discomfort than necessary for the experiment. Premature euthanization will be considered in case:

- The animal refuses to eat or drink
- Dehydration
- Acute weight loss (15% in 1-2 days) or continues weight loss (>20% compared to the start of the experiment)
- Circulation or respiratory problems
- Behaviour that strongly deviates from normal behaviour (either passive or hyperactive)
- toxicity effect of streptozotocin for other organs (initial assessment is visually observable discomfort, but as soon as discomfort is noted then blood samples are taken to monitor hyperglycemia)
- effects related to obese/diabetic mice, such as gross overweight resulting in mobility problems or severe dehydration or diabetic peripheral neuropathy.
- Circulation or respiratory problems from prolonged cold exposure.

In case of one (or more) of the above mentioned events, euthanization will be performed.

Indicate the likely incidence.

The expected incidence of premature euthanization is difficult to predict at this point, although we expect this to be below 5% due to the high level of in-house expertise.

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').

Intravenous injection of tracers under anaesthesia before scanning: mild

Scans (SPECT, PET, CT, MRI) under anaesthesia: mild

Diet: mild

Diabetes: moderate

Cold exposure: mild

The total discomfort of the animals is mild (60%) or moderate (40%).

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 are euthanized after the scan to perform a biodistribution and detailed tissue analysis. More information about the pharmacokinetics are relevant to describe the ability of the compound to target BAT under different conditions

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



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).
- 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'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	University Maastricht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3	Type of animal procedure Atherosclerosis

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 the study is to visualize established atherosclerotic plaques and/or perivascular BAT in these mice (typically in the aortic arch and proximal to the placed collars). We expect to evaluate maximum 5 tracers in this part of the study.

The primary outcome is "tracer uptake in perivascular BAT", with a secondary parameter of tracer uptake in (nearby) atherosclerotic plaques. These parameters are both image-related (their proximity to each other affects the imaging quality) and functionally related (highly active metabolic BAT lowers the incidence and severity of plaques).

The C57Bl6 mouse species will be subjected to a Western type diet (high fat) in combination with collar placement around the carotid arteries (control groups will not receive the diet nor carotid collar placement). The collar placement, although resulting in an additional burden to the study and the animals, is necessary to provide localised plaque formation in a predictable time schedule. We will perform our experiment at two different time points of the atherosclerosis disease (either in an early stage of atherosclerosis, or in an advanced stage).

Additionally, the effect of cold-induced perivascular BAT activation is taken into account by subjecting a subset of the animals to cold acclimatization treatment.

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

The surgical procedure we will use is the carotid collar placement [von der Thusen JH, Circulation, 2001] to induce atherosclerosis in a fast way and at a specific location within the mouse. This surgical procedure in combination with the genetic background of mice species and the Western type diet will lead to the development of atherosclerosis at a predictable location and within a predictable timeframe. The amount of animals we want to use will be limited as much as possible as this model is frequently used in our institution (hence, the high level of expertise will reduce the amount of unnecessary drop-out of animals during the experiment). At 2 weeks or 6 weeks post collar placement we will perform our study with our tracers, using SPECT, PET, CT and/or MRI.

Table 1: timetable of the experiment

Group \ Time	week 0	week 2	week 6
Control mice (room temperature)	-	-	Imaging, biodistribution (dissection)
Control mice (cold acclimatized during experiment)	-	-	Imaging, biodistribution (dissection)
ApoE ^{-/-} mice (room temperature)(early)	Collar placement	Imaging, biodistribution (dissection)	-
ApoE ^{-/-} mice (room temperature)(early)	Collar placement		Imaging, biodistribution (dissection)
ApoE ^{-/-} mice (cold acclimatized during experiment)(late)	Collar placement	Imaging, biodistribution (dissection)	-
ApoE ^{-/-} mice (cold acclimatized during experiment)(late)	Collar placement		Imaging, biodistribution (dissection)

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

Calculation of group sizes will be done using the formula of L. Sachs. As these are new tracers, a screening experiment will provide us with real data on the amount of spreading and the effect. As mentioned we aim to use known animal models to test our new tracers to reduce the amount of unnecessary animal drop-out.

B. The animals

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

Female ApoE^{-/-} mice will be used (C57Bl6 background). Animals will be ordered from a licensed breeder. We expect to use 60 C57Bl6 mice to investigate our objectives within this part of the project for the control group (estimated 6 animals per experimental group, multiplied by 5 tracers, multiplied by 1 time points, multiplied by 2 environmental conditions: $6 * 5 * 1 * 2 = 60$ animals). We expect to use 120 ApoE^{-/-} mice for the experimental group (estimated 6 animals per group, multiplied by 5 tracers, multiplied by 2 time points, multiplied by 2 environmental conditions). The life stage at which we would like to initiate our studies will typically be at the age of 8 to 10 weeks. This relatively young age is chosen because BAT has been shown to diminish as animals grow older. Mice species are chosen based upon previous experience and literature. Female mice are chosen because they (compared to male mice) show less dermatitis (this is especially the case in ApoE^{-/-} mice). In total we expect to use 180 mice (60 + 120).

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:

The evaluation of tracer properties, with the long-term aim of human applications, is only possible *in vivo*. Although *in vitro* steps are useful for screening compounds for a number of characteristics (ex vivo stability, solubility, receptor binding kinetics), they cannot replace the necessary amount of data obtained from *in vivo* experiments (pharmacodynamics, biodistribution,...).

Reduction:

The total amount of animals used for this study is kept as small as possible by applying different *in vitro* experiments before injecting into an animal. The minimal necessary amount of animals has been statistically determined by the method of L.Sachs.

Refinement:

Any injection or imaging experiment as well as surgery is performed under anaesthesia. Euthanization is induced immediately after the scan whenever appropriate.

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

The condition of the animal will be monitored by animal caretakers of the CPV or one of the responsible investigators. During experiments, at least one of the researchers is present to observe the wellbeing of the animals. Protocols for administration of analgesics will be strictly followed in order to reduce unnecessary suffering and pain.

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.

Not applicable.

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.

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.

Experiments regarding carotid collar placement will be conducted under anaesthesia according to GVSOLAS guidelines.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Female ApoE^{-/-} mice can show dermatitis (1-5% of mice).

Explain why these effects may emerge.

Strain-specific cause, in combination with the Western diet type.

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

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.

An animal will be euthanized once it experiences more discomfort than necessary for the experiment. Premature euthanization will be considered in case:

- The animal refuses to eat or drink
- Dehydration
- Acute weight loss (15% in 1-2 days) or continued weight loss (>20% compared to the start of the experiment)
- Behaviour that strongly deviates from normal behaviour (either passive or hyperactive)
- Complications after collar placements
- Loss of motor function or other brain related dysfunctions due to severe atherosclerosis blocking the blood flow to the brain.
- Severe dermatitis

In case of one (or more) of the above mentioned events, the animal will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

We expect this to be low due to the high level of in-house expertise.

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').

Intravenous injection of tracers under anaesthesia before scanning: mild (all animals, 180 mice)

Scans (SPECT, PET, CT, MRI) under anaesthesia: mild (all animals, 180 mice)

Carotid collar placement: moderate (66%, 120 mice)

Cold acclimatization: mild (90 mice)

The total discomfort of animals is mild (33%) or moderate (66%).

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.

It is important to assess the biodistribution of new tracers to determine the binding specificity of the new tracers in detail. Therefore we have to harvest the organs of the animals.

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

DEC-advies PV 2015-009/ [REDACTED]

Preambule:

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Imaging of brown adipose tissue metabolism*
3. **Titel van de NTS:** *Beeldvorming van bruin vet.*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC; *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon; [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon; [REDACTED]
6. **Adviestraject:** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC-UM 03-11-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken 11-11-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. **Afstemming IvD:**
 - De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD *dd. 03-11-2016*.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum 16-11-2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Algemene vraag: *Er wordt op grond van mogelijke huidproblemen gekozen voor uitsluitend vrouwelijke dieren. Zijn deze problemen inderdaad zo ernstig dat deze het gebruik van één geslacht legitimeren?*

Antwoord: Het is gekend dat mannelijke muizen onderling vechten. Op zich is dat geen dwingend probleem (zolang er tijdig ingegrepen wordt), maar bij muizen op een hoog vet dieet is de huid extra gevoelig voor inflammatie waardoor gevechten snel leiden tot ernstige huidproblemen.

Het probleem is beschreven in enkele publicaties (Immunity. 2015 May 19;42(5):953-64. ; Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Dec 15;241(3):303-10). Ook voor ApoE muizen is dit een gekend probleem (persoonlijke communicatie met proefdierpatholoog aan MUMC en art. 14proefdierdeskundige).

Om deze huidproblemen (en bijhorende verhoogde ongerief en uitval van proefdier) te vermijden, wordt er daarom gekozen voor vrouwelijke dieren.

Omdat er een significante impact is van sex hormonen op bruin vet activiteit (J Mol Endocrinol. 2012 May 29;49(1):R1-7), wordt er gekozen om maar 1 geslacht te gebruiken doorheen de hele studie, in casu vrouwelijke dieren. Het gebruik van beide geslachten zou leiden tot meer variatie en meer proefdieren.

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Vragen:

1. *Heeft U nagedacht over het ontwikkelen van dubbele labeling met radionucliden en fluorescentie om zowel (bruin) vetmassa als (bruin) vetmetabolisme tegelijk te kunnen meten/visualiseren?*

Antwoord:

Ja. Deze aanvraag gaat echter over tracers die uiteindelijk ook vertaald kunnen worden naar humane toepassingen, en dat is met fluorescente tags erg moeilijk. Daarom is het concept van fluorescente tags niet expliciet opgenomen in het voorstel. Het is wel zo dat, waar mogelijk, fluorescente tags toegepast zullen worden om ex vivo extra metingen te kunnen uitvoeren. Het is expliciet niet de bedoeling om fluorescente tags in te zetten als een in vivo visualisatie methode.

Los daarvan: een dubbele labeling zou niet toelaten om tegelijk bruin vetmassa en bruin vet metabolisme te meten, je kijkt immers altijd naar de distributie van de tracers, en of daar nu enkel een radioactief isotoop aanhangt of ook nog een fluorescente tag heeft geen impact op die distributie.

Het is in deze aanvraag wel zo dat er gebruik gemaakt wordt van CT om anatomische informatie te verkrijgen, inclusief de bruin vet massa.

2. *U eindigt letterlijk met: "After all, the overall goal is not to develop compound to produce nice images of BAT activity, but to use the quantitative information we obtain from the images in order to understand changes in BAT activity caused by a treatment or a disease, allowing for better first-stage diagnosis and treatment planning".*

Hoe gaat U dit verwezenlijken, met andere woorden, kunt U met deze technieken een diagnose stellen?

Antwoord: Deze aanvraag is bedoeld voor fundamenteel wetenschappelijk onderzoek in proefdieren, het is dus erg moeilijk om concreet te antwoorden op een vraag naar diagnostische applicaties in een humane situatie. Het eind doel blijft echter wel om ook in een humane situatie een diagnostische tool te hebben. Dit zou dan werken door de verbranding van lipiden in bruin vet, evenals de snelheid van opslag in wit vet, te kwantificeren en te vergelijken met waarden in gezonde personen.

In deze aanvraag wordt er gebruik gemaakt van gekende proefdiermodellen, en is de "diagnose" van de ziekte natuurlijk niet aan de orde. Het is wel zo dat de vergelijking van modellen onderling, na afloop van de studie, moet toelaten om duidelijk te maken welke parameters binnen het bruin vet significant verschillend zijn in een ziektemodel. Deze parameters kunnen later dan ook in een humane setting onderzocht worden.

3.3. Belang

Algemene opmerking:

1. *De DEC-UM verzoekt U dit deel duidelijker te beschrijven. Het is nu alsof er gezocht wordt naar toepassingen voor de te ontwikkelen tracers.*

Antwoord: De tekst is aangepast, met verwijzing naar een wetenschappelijk aspect van de studie en een (langere termijn) sociaal aspect.

Er staat nu:

Scientifically: considering the research into the field of BAT (and lipid metabolism in general) in laboratory animals throughout the world, there is a need for non-invasive imaging techniques that allow longitudinal studies about metabolic activity of BAT. The study we propose will deliver a number of radiopharmaceuticals, suitable for this task. Once fully developed and implemented, this will result in better studies, but also the use of fewer animals.

Socially: The object of this study is to generate tracers that are able to quantify a number of metabolic parameters in BAT. Due to the nature of these tracers (radiopharmaceuticals), these tracers can also be applied in humans once animal experiments proved successful. In these human studies, information can be gathered about BAT, in relation to diseases such as obesitas, diabetes and atherosclerosis. This may lead to diagnostic applications (by means of comparing non-invasive imaging parameters in healthy and diseased subjects), or even new therapeutic applications (by the newly gathered information).

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1

Vragen:

1. *Kunt U toelichten wat de reden is dat U hier over gaat op de term 'metabool syndroom'? In het hele voorstel wordt niet duidelijk dat U inderdaad metabool syndroom gaat bestuderen. Obesitas kan een aanleiding zijn voor het ontstaan van metabool syndroom (met bijbehorende insulineresistentie), maar U wilt obesitas en diabetes onafhankelijk van elkaar bestuderen.*

Antwoord: De term metabool syndroom (model) is inderdaad verwarrend. Ik heb de term daarom vervangen door "lipid dysregulation" (model), zowel in het PV als in appendix 2. Deze term beschrijft beter onze focus op de dysregulering van het lipiden metabolisme in obesitas en diabetes.

2. *Hoe gaat U de 15 compounds testen op in vitro binding? Wat is de voorspellende waarde van de in vitro data? Waarom 15 compounds?*

Antwoord: Het MUMC beschikt over in vitro celculturen van humaan BAT en WAT, verkregen vanuit verschillende vrijwilligers. Deze cellen zullen gebruikt worden om de opname van tracers te bestuderen (quantiteit opname, effect stimulatie cellen, ...) om in te schatten of de nieuwe tracers in vivo slaagkansen hebben. Het gaat hierbij om relatief eenvoudige parameters (een gebrek aan in vitro opname is een duidelijke contra-indicatie voor in vivo experimenten, net als gebrek aan bv. adrenaline-stimulator effect). De voorspellende waarde is vooral uitsluitend: een gebrek aan in vitro opname is een sterke indicatie dat er in vivo weinig hoop op BAT-specifieke opname is. Het aantal van 15 compounds is een inschatting op basis van voorbije ervaringen en het aanwezige personeel, rekening houdend met de klassen van producten waarin we ons onderzoek willen uitvoeren (triphenylphosphonium, chylomicrons, vrije vetzuren, triglyceriden).

3. *Hoe evalueert U de in vivo karakteristieken, U geeft aan dat dit BAT binding en hoge clearance is in ander weefsel, heeft u referentiewaardes?*

Antwoord: Er zijn geen referentiewaardes beschikbaar. De interpretatie van biodistributie/pharmacokinetiek is een sterk tracer-afhankelijk proces. 1% opname is voor de ene tracer rampzalig laag, maar voor een andere tracer ruim voldoende. Referentiewaardes zijn enkel mogelijk bij vergelijkend onderzoek, maar niet bij fundamenteel onderzoek waarbij totaal nieuwe tracers bestudeerd worden.

3.4.2

Vragen:

1. *U gaat na de karakterisatie vrijwel direct 5 stoffen in een ziektemodel testen, als controle de gezonde muis, dan de obese en de diabetes muis.*

Die verdeelt U allemaal in 3 groepen: non-treated, diet en cold exposure. Kunt U de noodzaak en strategie hier achter uitleggen?

Antwoord: Tijdens dit onderzoek worden inderdaad 2 verschillende parameters bestudeerd. Die parameters interageren sterk met elkaar, waardoor het hele onderzoek dus samen moet gebeuren.

Parameter 1 is daarbij het lipidenmetabolisme vanuit een dier-standpunt. Dit kan een controle dier zijn, of een dier met een gewijzigd metabolisme door ofwel diabetes ofwel obesitas.

Parameter 2 is de omgevingstemperatuur: bruin vet wordt sterk geactiveerd door een koude omgeving, en die activatie zorgt (bij gezonde controle dieren) onder andere voor een snellere klaring van lipiden uit het plasma.

Het is op dit moment echter niet duidelijk hoe die verschillende parameters elkaar beïnvloeden. Zo is het onduidelijk of de snellere lipidenklaring in controle dieren nog steeds even uitgesproken is in ziektemodellen, tot op welke hoogte koude acclimatisatie beschermt tegen obesitas, en of het ziektemodel misschien een impact heeft op het intracellulaire metabolisme van bruin vet of op opnamemechanismen van bruin vet. Daarom wordt er gekozen om beide parameters gelijktijdig te onderzoeken in een experiment waarbij de gekozen parameters met elkaar gekruist worden (3 ziektemodellen (gezond-diabetes-obese) met 3 omgevingstemperaturen (normaal, korte koude activatie of koude acclimatisatie)).

2. Kunt U daarnaast het gebruik van 5 stoffen toelichten? Waarom 5 van de 15? Dat geldt bij zowel metabool syndroom als atherosclerosis.

Antwoord: Deze keuze is uit praktische overwegingen genomen: we hebben een beperking in personeel, apparatuur en budget waardoor het niet mogelijk is om alle succesvolle tracers uit de screening daadwerkelijk mee te nemen naar de ziektemodellen. Daarom beperken we ons tot de meest succesvolle kandidaat per klasse tracer (triphenylphosphonium, chylomicrons, vrije vetzuren, triglyceriden), aangevuld met 1 "wild card" voor een interessante vinding tijdens het onderzoek (nieuwe klasse tracer). Daarnaast willen we uiteraard het aantal muizen in onze studie niet onnodig groot maken door semi-repitiief onderzoek te doen met varianten op reeds geteste tracers.

3.4.4

Appendix 1

Algemene opmerking:

1. Het is nog weinig inzichtelijk gemaakt wat er precies gaat gebeuren met de dieren. Per groep zou een tijdschema verheldering kunnen geven over de procedures die de dieren zullen ondergaan.

Antwoord: Er is een tijdschema toegevoegd onder hoofdstuk (experimental approach and primary outcome parameters) in tabelvorm. Hierin staat per groep gespecificeerd wat er precies gebeurt met de dieren.

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. U vraagt tevens dieren voor histochemische / PCR analyse, die geen tracers zullen ontvangen (groep 4). Wat is de reden dat U deze groep voor elke te onderzoeken tracer wilt includeren?

Antwoord: Elke tracer heeft een bepaald doelwit (receptor, transportproteïne, ...) op het doelorgaan (bruin vet). Soms is dit doelwit ook aanwezig in andere organen (denk aan de lever, of wit vet, ...). De expressie van deze doelwitten is een aanname (op basis van literatuurgegevens, ofwel rechtstreeks uit een publicatie ofwel afgeleid uit een publicatie).

Wanneer er aangetoond wordt dat een tracer in vivo naar het juiste orgaan gaat, is het noodzakelijk om aan te tonen dat de veronderstelde expressie van het doelwit ook daadwerkelijk zo is.

Het is heel erg moeilijk tot zelfs onmogelijk om beeldvormingsresultaten van een tracer te publiceren zonder histochemische / PCR analyse van de expressie van het doelwit van de tracer.

Uiteraard is het zo dat, indien 2 sterk analoge tracers eenzelfde doelwit zouden hebben, er natuurlijk slechts 1 keer een histochemische analyse gebeurt van de weefsels.

2. *U wilt 1-3 imaging experimenten per 24 uur gaan uitvoeren. Dit is "PET of SPECT" plus "CT of MRI". Wat doet U wanneer U 1 imaging experiment gaat doen? En wanneer er drie uitgevoerd worden, welke zijn dat dan?*

Antwoord: 1 beeldvormingsexperiment bestaat uit de combinatie van moleculaire beeldvorming (PET of SPECT, afhankelijk van het isotoop waarmee de tracer gelabeld is) en anatomische beeldvorming (CT of MRI, afhankelijk van de klasse van de tracer). Als er 3 imaging experimenten uitgevoerd worden, dan wordt de combinatie 3 keer herhaald. Het exacte aantal imaging experimenten (1, 2 of 3) hangt af van de klaring van de tracer, maar dat kan pas ter plekke vastgesteld worden.

3. *These are both go/no-go parameters for every tracer, as in case of insufficient plasma stability or inadequate blood clearance, further in vivo studies are not warranted.*

Kunt U de zin hierboven verder definiëren? Wat maakt het een go?

Antwoord: Het is erg moeilijk om dit op voorhand te definiëren, zeker niet op het niveau van een PV.

Tracers die heel snel klaren (binnen 60 seconden volledig uit het bloed gefilterd naar de urine) of heel traag (in een extreem geval bijvoorbeeld geen klaring uit het bloed) zijn uiteraard niet geschikt voor beeldvorming achteraf. Waardes die hier tussenin liggen zijn echter moeilijker te interpreteren of te definiëren want zijn tracer afhankelijk: bij sommige tracers (lipofiele) wordt een trage klaring verwacht, terwijl bij andere (hydrofiele) een snelle klaring verwacht wordt; een sterke afwijking van het verwachte klaringspatroon is dan een reden voor een no-go. Omdat dit echter per tracer te bepalen is (en de meeste tracers nog moeten gesynthetiseerd worden), is het niet mogelijk om dit op voorhand te definiëren.

De in vivo stabiliteit is nog complexer: er is immers een zekere tolerantie voor de vorming van metabolieten bij tracers die "snel" klaren, maar niet bij tracers die traag klaren. Daar komt dan nog een tracerspecifiek item bij: bij tracers die (theoretisch) die snel in het doelwit opnemen en vervolgens in het doelwit irreversibel gebonden zijn is het juist een voordeel dat de resterende klaring uit het bloed versneld zou worden door de vorming van hydrofiele metabolieten.

Het is belangrijk om te onthouden dat appendix 1 uitgevoerd wordt met totaal nieuwe tracers waar nog maar zeer weinig tot geen kennis over beschikbaar is. Nu al strenge criteria vastleggen voor go/no-go momenten zou onwijs zijn, terwijl losse criteria dan weer onnuttig zijn.

4. *Wat is het verschil in "blood clearance" en "biodistribution in time"? Kunt U voor groep 3 niet ook alle dieren uit groep 2 gebruiken?*

Antwoord: "blood clearance" is de snelheid van klaring uit het bloed. Dit kan uitgevoerd worden door bloed stelen te nemen op regelmatige tijdstippen. "biodistribution in time" is de biodistributie van de tracer in het hele dier, dit kan uitgevoerd worden (op een relatief nauwkeurige wijze) door beeldvorming, en (op zeer nauwkeurige wijze) door het dier te doden en de biodistributie in elk orgaan specifiek te bepalen.

Groep 2 wordt gebruik om het ideale tijdstip te bepalen, de dieren hier moeten blijven leven tot het laatste beeldvormings-tijdstip (max 24u na injectie). Op basis van de resultaten hiervan wordt een ideaal tijdstip voor beeldvorming en gedetailleerde biodistributie bepaling bepaald.

In groep 3 worden de dieren gescand bij het bepaalde ideale tijdstip en vervolgens gedood, om ook gedetailleerde biodistributiedata te kunnen verkrijgen op dat tijdstip (die waren tot dan toe niet beschikbaar).

De gedetailleerde biodistributie laat toe om organen die door beeldvorming moeilijk in beeld gebracht kunnen worden (denk bijvoorbeeld aan pericardiaal bruin vet) toch te kunnen analyseren.

Het is dus niet mogelijk om de dieren van groep 2 te gebruiken voor de resultaten zoals beoogd in groep 3.

B. De Dieren.

5. *U geeft aan dat er veel bekend is over deze stam, doelt U dan op de J of de N variant en welke leverancier? Deze stam staat bekend om een afwijking in het metabolisme, is U daar iets over bekend en is dat hulpvol bij uw studie? De keuze voor alleen vrouwen m.b.t. discomfort is onduidelijk.*

Antwoord: Er wordt in de literatuur van beide stammen gebruik gemaakt, meestal met de N variant. Ik heb geen informatie die er op wijst dat er (voor bruin vet) een verschil is tussen de J en de N variant. De afwijking in het metabolisme heeft voor zover ik kan nagaan geen impact op de experimenten die wij willen uitvoeren. De leverancier voor dit experiment zal, naar alle waarschijnlijkheid, Charles River zijn (in elk geval een goedgekeurde leverancier, met licentie).

De keuze voor vrouwen m.b.t discomfort is ingegeven door persoonlijke communicaties met andere onderzoekers die muizen gebruiken voor atherosclerose onderzoek en een proefdierpatholoog, evenals publicaties over verhoogd ongerief bij mannelijke proefdieren op een hoog vet dieet ((Immunity. 2015 May 19;42(5):953-64. ; Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Dec 15;241(3):303-10). Omdat ik vanwege ongerief-verminderende redenen in appendix 2 en 3 daarom gebruik wil maken van vrouwelijke proefdieren, en gezien de mogelijke verschillen tussen mannen en vrouwen wat betreft bruin vet (J Mol Endocrinol. 2012 May 29;49(1)) wil ik me daarom beperken tot maar 1 geslacht doorheen de gehele studie, namelijk het vrouwelijke.

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

6. *Wanneer U meerdere scans gaat doen onder anesthesie, blijft het dier dan onder anesthesie? Zo ja, heeft dat invloed op het (bruin) vetmetabolisme?*

Antwoord: Het dier blijft enkel onder anesthesie gedurende de scan. Dit is ter verduidelijking toegevoegd in de tekst.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen.

7. *Als het mogelijk is om de geïnjecteerde hoeveelheid van een substantie te reduceren, waarom doet U dat dan niet meteen?*

Antwoord: De bepaling of dit al dan niet mogelijk is hangt af van de beeldkwaliteit, de biodistributie en de specifieke activiteit (uitgedrukt in Bq per mol) van de tracer. Dit kan dus pas bepaald worden na een eerste scan. Ik heb ter verduidelijking de tekst aangepast.

K. Classificatie van ongerief.

8. *Kunt U het ongerief nog verder definiëren door aantallen te noemen? Aantal injecties, aantal x anesthesie?*

Antwoord: Ik heb de tekst aangepast om het aantal injecties weer te geven (zowel per dier als in totaal in deze appendix).

Appendix 2

Algemene opmerkingen:

1. *Deze appendix gaat niet over het bestuderen van metabool syndroom. Er worden twee diermodellen bestudeerd: obese muizen en diabete muizen. Wat is de reden dat deze in 1 appendix worden gecombineerd, maar het atherosclerosemodel apart wordt beschreven?*

Antwoord: De titel "metabool syndroom" is verkeerd gekozen, het gaat om dieren met storingen in het lipidenmetabolisme (ofwel door obesitas, ofwel door diabetes). De titel van de appendix is hierom aangepast.

Appendix 3 gaat over atherosclerose, waar een hoog vet dieet uiteraard ook belangrijk is, maar de focus hier ligt op de analyse van perivasculair bruin vet en niet interscapulair bruin vet. De applicatie van dit model vereist ook (in tegenstelling tot de modellen in appendix 2) invasieve chirurgie. De analyse van het weefsel en de beeldvormingstechnieken in appendix 3 is deels anders dan in appendix 2, maar ook de onderliggende biologische aspecten verschillen (perivasculair bruin vet heeft andere genetische kenmerken dan interscapulair bruin vet), daarom wordt dit in een aparte appendix behandeld.

2. *Zie appendix 1 voor algemene zaken.*

Antwoord: Er is in appendix 2 een figuur met tijdslijn aangegeven, waar vermeld is wat er gebeurt met dieren in een groep. Tevens is een tabel toegevoegd met de leeftijd van de dieren doorheen het experiment.

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. *Tabel 1 het tijdsschema lijkt te suggereren dat de dieren na de imaging in experiment gehouden worden?*

Antwoord: De dieren worden op het einde van het experiment gedood. De figuur is aangepast om verwarring te voorkomen.

B. De Dieren.

2. *De redenering om dieren van 8-10 weken oud te gebruiken is vanwege de hoeveelheid aanwezig bruin vet (wordt minder met de leeftijd). Echter, om obesitas te induceren hebt U al 4 maanden nodig, vervolgens duurt het nog een maand voor de dieren gescand worden, vanwege de koudstress. Dat betekent dat de dieren dus minstens 7 maanden oud zijn wanneer U ze scant. Geldt dit ook voor de diabetesmuizen? En voor de atherosclerosemuizen? Houdt U daar rekening mee in appendix 1?*

Antwoord:

- Appendix 1 houdt hier geen rekening mee. In appendix 1 wordt er gewerkt zonder potentieel storende factoren (zoals een te hoge leeftijd of een hoog vet dieet), teneinde de analyse van nieuwe tracers onder optimale omstandigheden mogelijk te maken.
- Het klopt dat dieren uit de obesitas groep ten tijde van beeldvorming 3 maand ouder zijn dan de andere dieren in deze appendix, en 4 maand ouder dan dieren uit appendix 1. We zijn ons bewust dat dit een extra factor is in ons model, maar schatten de impact van deze factor als aanvaardbaar in, rekening houdende de beschikbare kennis over de impact van leeftijd op BAT.
- Er is geen studie voorzien om het aspect leeftijd op het bruin vet van de dieren te bepalen. Het aspect van de impact van leeftijd op BAT activiteit is immers reeds vroeger bestudeerd (zie *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):277-359 voor een review)

F. Huisvesting en verzorging.

3. *Incorrect beantwoord, de muizen worden bij een lagere T gehuisvest.*

Antwoord: De dieren worden in principe steeds gehuisvest bij een standaard (kamer) temperatuur. Een aantal van de dieren wordt, gedurende maximaal 6 uur per dag, in het kader van een experiment blootgesteld aan koude. Deze blootstelling aan koude werd tot dusver aanzien als experiment, en niet als huisvesting (DEC 2012-001 en DEC 2013-024).

De huisvesting in de aanvraag is aangepast naar de opmerking van de DEC, zodat duidelijker is hoe de dieren gehuisvest worden.

H. Pijn en pijnbestrijding.

4. *Is daily wel genoeg bij de koude blootstelling?*

Antwoord: Ik begrijp deze vraag niet. De dieren krijgen geen dagelijkse pijnbestrijding. Uit eerdere experimenten (DEC 2012-001 en DEC 2013-024) is reeds vastgesteld dat het ongerief van de dieren tijdens koude acclimatisatie mild tot matig is, en dat pijnbestrijding hier niet nodig is. Ik begrijp ook niet hoe pijnbestrijding bij koude blootstelling mogelijk zou zijn. Gemiddeld genomen hebben de proefdieren enkele dagen zichtbaar ongerief gedurende koude blootstelling (duidelijk rillen gedurende het eerste half uur van blootstelling aan koude), daarna is het ongerief duidelijk afgenomen. Van "pijn" is nooit sprake.

Het is wel zo dat de dieren verdoofd worden tijdens de injectie van de tracer en tijdens de beeldvorming.

J. Humane eindpunten.

5. *Heeft U bij de berekening van de aantallen ook rekening gehouden met deze eventuele uitval?*

Antwoord: Ja. De uitval is bij deze modellen bovendien relatief klein (maximaal 10%).

K. Classificatie van ongerief.

6. *Dat hangt erg af van de opzet, individueel bereik je een beter experiment, omdat de T gewijzigd kan worden door dicht op elkaar te kruipen. Bij langdurige koude blootstelling (>x uur) bestaat er een kans op Torpor, een soort winterslaap, hoe schat U die kans in en wat doet dit met Uw experiment?*

Antwoord: Op basis van eerdere ervaringen (DEC 2012-001 en DEC 2013-024) is vastgesteld dat de voorgestelde methode (6u per dag koude blootstelling, met kooiverrijking en in groep) een effectieve methode is om bruin vet te activeren (vaststelling op basis van fysiologische gegevens en beeldvormingsgegevens). Torpor is tot op heden niet waargenomen, ik schat de kans dat dit alsnog voorvalt op verwaarloosbaar klein in door de opzet van het experiment (dieren zijn 18u per dag gehuisvest op kamertemperatuur, waardoor Torpor niet voorkomt).

7. *De ApoE-/- kan geen vet opnemen schrijft U, zou U het ongerief daardoor anders inschatten dan bij de WT muis?*

Antwoord: ApoE-/- dieren hebben inderdaad een sterk verminderde klaring van lipiden uit het bloed, door gebrek aan expressie van ApoE. Dit leidt op lange termijn (> 9 maand) inderdaad vermoedelijk tot additioneel ongerief (bijvoorbeeld atherosclerosis). Gedurende de termijn die in deze appendix echter wordt aangehouden, zijn deze fenomenen nog niet tot uiting gekomen en is er van additioneel ongerief nog geen sprake.

Appendix 3

Algemene opmerkingen:

1. *De precieze opzet van deze experimenten is onduidelijk. Wat is het tijdsframe van deze studie? Wat gaat U precies doen?*

Antwoord: In deze studie wordt bestudeerd in welke mate de tracers perivascularair bruin vet kunnen visualiseren en, secundair, in welke mate ze atherosclerotische plaques kunnen visualiseren. Tabel 1 is toegevoegd, met daarin een tijdstabel. Gezien de waarschijnlijke impact van de omgevingstemperatuur, wordt er een (beperkte) studie hiervoor meegenomen in de opzet.

2. *De vraag die hierbij naar voren komt is: Zijn dit dezelfde 5 stoffen, of kunnen dit andere zijn?*

Antwoord: Dit kunnen andere stoffen zijn.

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. *Wat is een appropriate model?*

Antwoord: Dit is de C57Bl6 muis (inclusief dieet en collar placement). De tekst is aangepast om dit te verduidelijken.

B. De Dieren.

2. **Opmerking:** Hier zullen de muizen ongeveer 16 weken oud zijn bij imaging. In tegenstelling tot de obese muizen, die ongeveer 28-30 weken oud zullen zijn bij imaging.

Antwoord: Correct. We zijn ons bewust van de impact van de leeftijd op het bruin vet, en nemen dit mee als een factor bij het obesitas model.

K. Classificatie van ongerief.

3. *Kunt U het ongerief nog verder definiëren door aantallen te noemen? Aantal injecties, aantal x anesthesie.*

Antwoord: Het ongerief is verder gedefinieerd.

- Datum antwoord 15-12-2016
- Verstreckte antwoorden: Zie hierboven
- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. **Eventuele adviezen door experts:** (niet lid van de DEC-UM) **N.V.T.**

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. **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. **N.V.T.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan.

De DEC-UM 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-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.
N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

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.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen.

Zie antwoord op vraag C5.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel wetenschappelijke en translationele project dat gericht is op het ontwikkelen van een serie nieuwe radiofarmaca (tracers) waarmee in preklinische en klinische setting het bruin vet (BAT) metabolisme zichtbaar en kwantificeerbaar gemaakt kan worden, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep/patiënt en diens naasten, en ook de medische wetenschap en de samenleving als geheel.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door: injecties, scannen van het dier, induceren van diabetes en overgewicht en leven met deze aandoeningen, genetische modificatie, induceren van atherosclerose door collarplaatsing en daarmee leven, dieet, blootstelling aan koude en opofferen aan het eind van de proeven. Gedurende de proeven zullen de dieren gering tot matig ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over tracers die veranderingen in BAT kunnen afbeelden en kwantificeren bij verschillende ziektebeelden. Uiteindelijk kan meer kennis over het BAT metabolisme leiden tot verbeterde diagnostische en therapeutische mogelijkheden.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Meer kennis over de rol van BAT bij obesitas, diabetes en atherosclerose, levert behalve een beter begrip van deze aandoeningen ook bouwstenen door een snellere diagnose en betere therapie. Hierdoor kan uiteindelijk de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. obesitas, diabetes en atherosclerose komen zijn veel voorkomende aandoeningen. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

Proefopzet en haalbaarheid

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

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

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 antwoord toe.

De DEC-UM 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 en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling 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 de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe. **N.V.T.**
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 de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren.

De DEC-UM 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. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door: injecties, scannen van het dier, induceren van diabetes en overgewicht en leven met deze aandoeningen, genetische modificatie, induceren van atherosclerose door collarplaatsing en daarmee leven, dieet en blootstelling aan koude. De dieren worden aan het eind van de proef opgeofferd.

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 antwoord toe.

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

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord.

De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

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. Onderbouw uw antwoord.

Naar de mening van de DEC-UM 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 statistische analyse middels een poweranalyse.

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 antwoord toe.

De DEC-UM 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. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

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. Onderbouw uw antwoord.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC-UM reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

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? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

In onderhavige projectaanvraag worden wel dieren van een eenvormig geslacht gebruikt, hetgeen door aanvrager wetenschappelijk is onderbouwd. Alhoewel de DEC-UM 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-UM 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 de richtlijn.

Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Adoptie is ten aanzien van onderhavige aanvraag niet opportuun daar het geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren betreft.

NTS

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

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over tracers die het BAT metabolisme kunnen visualiseren en kwantificeren de opoffering en het milde en matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Imaging of brown adipose tissue metabolism"?

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

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

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *matig voordeel.*

Algemeen: *relevante groei van medische kennis.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Imaging of brown adipose tissue metabolism" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na voornamelijk mild en hooguit matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad.

De integriteit van de dieren wordt geschaad door: injecties, scannen van het dier, induceren van diabetes en overgewicht en leven met deze aandoeningen, genetische modificatie, induceren van atherosclerose door collarplaatsing, dieet, blootstelling aan koude en opofferen aan het eind van de proeven.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot kennis over tracers die veranderingen in BAT kunnen afbeelden en kwantificeren bij verschillende ziektebeelden. Daardoor krijgen de onderzoekers meer inzicht in het metabolisme van BAT. Meer kennis over de rol van BAT bij obesitas, diabetes en atherosclerose, kan behalve een beter begrip van deze aandoeningen, uiteindelijk ook bouwstenen opleveren voor een snellere diagnose en betere therapie. Hierdoor kan uiteindelijk de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Obesitas, diabetes en atherosclerose zijn veel voorkomende aandoeningen. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag.

*De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over tracers die het BAT metabolisme kunnen visualiseren en kwantificeren de opoffering en het milde en matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project *Imaging of brown adipose tissue metabolism*?" bevestigend. Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.*

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de 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 bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-UM 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 onderzoekers kiezen voor een onderzoeksstrategie, waarbij eerst in vitro onderzoek wordt gedaan en daarna, bij veelbelovende resultaten, wordt overgegaan tot in vivo onderzoek. Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De DEC-UM 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-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "*Imaging of brown adipose tissue metabolism*" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "*Imaging of brown adipose tissue metabolism*" van een positief advies.*

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X De DEC-UM adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is **unaniem** tot stand gekomen.

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.

N.v.t. Daarenboven is de DEC-UM niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

16 FEB. 2017

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002017807

Bijlagen

1

Datum 15 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Imaging of brown adipose tissue metabolism" met aanvraagnummer AVD107002017807. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "Imaging of brown adipose tissue metabolism" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 februari 2017 tot en met 30 december 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 8 februari 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC heeft ons aanvullend geadviseerd over eventuele strijdigheid met andere wetgeving, mogelijke milieueffecten, de relatie tussen het directe doel en het indirecte doel, de relatie tussen het directe doel en de status van het

onderzoeksveld en de onderbouwing van het toepassen van huisvesting anders dan volgens bijlage III van de richtlijn.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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

Datum:
15 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017807

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
15 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017807



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht

Adres: Postbus 616

Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT

Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 februari 2017 tot en met 30 december 2021, voor het project "Imaging of brown adipose tissue metabolism" met aanvraagnummer AVD107002017807, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Post-doctoraal onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

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

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Screening pharmacokinetics and biodistribution				
	Muizen (Mus musculus) /	360	100% Licht	
3.4.4.2. Lipid disregulations				
	Muizen (Mus musculus) /	450	40% Matig 60% Licht	
3.4.4.3. Atherosclerosis				
	Muizen (Mus musculus) /	180	66% Matig 33% Licht	

Aanvraagnummer:
AVD107002017807

Voorwaarden

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

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

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



Aanvraagnummer:

AVD107002017807

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:

AVD107002017807

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.