



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50100	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO	
1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.	Volgnummer	Titel dierproef
<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Ex vivo bestuderen van orgaanfuncties en de kinetiek en effecten van stoffen in darm, lever en/of nier

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voor dit onderzoek maken we gebruik van weefsel van varkens. De dieren worden opgeofferd en één of meerdere organen/type weefsels worden geïsoleerd om toe te passen in ex vivo modellen om zo orgaanfuncties en gedrag en effect van geneesmiddelen en voedingsmiddelen te onderzoeken. Op die manier kan met 1 dier verschillende condities getest worden.

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

Onder terminale anesthesie zullen organen worden geïsoleerd, eventueel gecanuleerd en overgebracht naar ex vivo modellen of orgaan perfusiesystemen. Hierna zal het dier worden getermineerd of ter beschikking worden gesteld voor andere onderzoeksdoeleinden.

Indien nodig dan zullen de dieren voorafgaand aan de isolatie, terwijl ze al onder anesthesie zijn, gehepariniseerd worden. Dit om stolling van bloed in de organen te voorkomen, dit kan de metingen verstoren.

Onder farmacokinetiek valt ook het bestuderen van drug-drug interacties. Hiervoor kan het nodig zijn dat er voorafgaand aan het experiment in vivo al een bepaalde plasma spiegel of concentratie van de te bestuderen stof aanwezig moet zijn om de interactie van een andere stof hierop ex vivo te kunnen bestuderen. **Ook kan het voor onderzoek naar de orgaanfunctie nodig zijn om specifieke genen of genproducten te inactiveren door middel van virale transfectie met AAV-vectoren.** Hiervoor kan het nodig zijn om de dieren voorafgaand aan terminatie of onder terminale anesthesie een oplaad dosis krijgen of vooraf worden behandeld met de stof. Manier van toediening zal afhankelijk zijn van de te testen stof, bij

voorkeur zal oraal worden toegediend (bijvoorbeeld via het voer of met capsule), first pass effect is immers via de lever en hiervoor is dat de meest logische route. Indien nodig zal er bloedafname, speeksel, faeces en/of urine verzameling plaats vinden.

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

Aantal dieren per studie en per groep is afhankelijk van de vraagstelling en de belangrijkste uitleesparameters. Met de toegepaste ex vivo methodes kunnen we meerdere condities in 1 experiment testen, dat beperkt het aantal benodigde dieren tot een minimum.

Omdat de experimenten arbeidsintensief zijn kunnen er maar max 2 dieren per maand worden ingezet (dus max 24 per jaar)=120 per 5 jaar.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Varkens	Gecertificeerd SPF fokbedrijf	Jonge big tot volwassen varken	120	m/v	Nee	SPF mest varken

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Wat betreft het translationele aspect en de vervolgstappen richting de mens weten we dat het gebruik van varkens materiaal een goede uitgangsbasis vormt voor het opzetten van de techniek, de grootte van de organen is vergelijkbaar, maar ook dat varkensmateriaal geschikt is om een voorspelling te kunnen doen voor de mens. Het maagdarm kanaal van het varken lijkt sterk op de van de mens en veel processen zijn vergelijkbaar, waardoor voor een groot aantal medicijnen de farmacokinetiek vergelijkbaar zal zijn met de mens. Er zijn echter uitzonderingen, zoals bijvoorbeeld beschreven door Dalgaard in 2015 (Comparison of minipig, dog, monkey and human drug metabolism and disposition, J. Pharmacol. Toxicol Methods, 2015), en hiermee zal dan ook rekening mee gehouden worden.
Herkomst	Alleen indien geen geschikt rest materiaal van een andere proef of slachthuismateriaal beschikbaar is, zal worden overgegaan tot het aankopen van een dier. De aangekochte varkens zijn afkomstig van een gecertificeerd SPF fokbedrijf.
Levensstadia	Afhankelijk van de vraag zal gekozen worden voor varkens < 15 kg (jonge biggen), varkens van 15-60 kg of varkens > 60 kg.
Aantal	Voor darm studies verwachten we 60 varkens nodig te hebben in een periode van 5 jaar (Omdat we met de huidige opzet 96 condities in 1 varken kunnen testen, waaronder regionale absorptie van stoffen, verschillende doseringen/formuleringen, is er veel vraag naar deze experimenten. We verwachten 1 varken per maand in te zetten voor deze doeleinden). Voor de lever en nier PK studie verwachten we max 120 dieren nodig te hebben. We streven er naar om darm en lever en nier studies zoveel mogelijk te combineren en zouden dan max 120 dieren nodig hebben in 5 jaar
Geslacht	We hebben geen voorkeur voor bepaald geslacht en zullen gebruik maken van het dier dat op dat moment beschikbaar is.
Genetisch gewijzigd	n.v.t.
Stam	SPF mest varken

## C. Huisvesting en verzorging

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

Ja > Dieren worden bij een andere instelling met vergunning gehuisvest en het toezicht wordt gedelegeerd naar de IvD van die instelling.

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

#### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Bij toedieningen via i.v of s.c route vind er kortdurend pijn plaats ten gevolge van de injectieprik. Deze pijn is zeer kortdurend en pijnverlichting is hierbij niet van toegevoegde waarde.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

#### E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

#### F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Bij proeven waarbij alle handelingen plaatsvinden onder terminale anesthesie is het ongerief terminaal. Naar schatting is dit het grootste gedeelte van de experimenten (90%).

Bij proeven waarbij dieren vooraf behandeld worden met therapeutica, AAV-vector of een microdosering van een tracer kan het ongerief licht zijn door de effecten van de toegediende stof.

We verwachten dat in maximaal **10%** van de proeven een toediening voor nodig is. Bij orale toediening via het voer is door de handeling geen ongerief te verwachten (**3%**), Bij het toediening van een oplaaddosis onder terminale anesthesie is ook geen extra ongerief door de handelin (**3%**). Als voor de oplaaddosis, **AAV-transfectie** of microdosering een injectie of infusie nodig is die niet onder anesthesie kan plaatsvinden is het ongerief ten gevolge van de handeling licht (**4%**).

We verwachten dat de te testen stoffen, die waarschijnlijk mede worden aangeleverd door de voedingsindustrie of de farmaceutische industrie, al zover ontwikkeld en onderzocht zijn dat deze geen nadelige effecten zullen hebben op het dier. Deze medicijnen of voedingsmiddelen/supplementen zullen al zover doorontwikkeld zijn dat ons model de stap is voordat de stoffen daadwerkelijk in klinische trials zullen worden getest, er zullen dus al veel eigenschappen van deze stof bekend zijn. Hoewel dit niet wordt verwacht, zal bij optreden van onbekende bijwerkingen die een negatieve invloed hebben op het welzijn van het dier de toediening direct worden gestopt **en indien nodig het dier uit experiment worden genomen.**

	<b>Procedure</b>	<b>Percentage van de dieren</b>	<b>Ongerief</b>
1	Handelingen onder terminale anesthesie	90% (n=107)	Terminaal
2	Als 1 +Toediening via dieet	3% (n=4)	Terminaal
3	Als 1 + Toediening onder terminale anesthesie	3% (n=4)	Licht
4	Als 1 + Toediening voorafgaand aan terminale anesthesie	4% (n=5)	Licht

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

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

Vervanging	Gebruik maken van puur in vitro systemen is voor complexe organen nog niet mogelijk. Naast varkensweefsel maken we zoveel mogelijk gebruik van humaan weefsel, maar hiervan is te weinig beschikbaar om de vaak veel verschillende condities te kunnen testen, en wordt varkensweefsel als goed alternatief gezien als tussenstap met goede vertaling naar de humane situatie.
Vermindering	We dragen bij aan het verminderen en verfijnen van dierproeven doordat er in 1 varken meerdere condities worden bestudeerd, darm/lever en nier functie. Ook zullen we na isolatie van de organen de dieren en/of organen ter beschikking stellen voor overig kortdurend wetenschappelijk onderzoek dat onder terminale anesthesie plaats kan vinden. Daarnaast wordt waar mogelijk gebruik gemaakt van materiaal afkomstig uit andere experimenten of van slachthuismateriaal. Dit zal met name van toepassing zijn voor pilot experimenten en voor de validatie studies. Voor overige experimenten kan nu nog niet voorzien worden of dit mogelijk is. We streven ernaar om alleen ex vivo materiaal te gebruiken als duidelijk is dat de onderzoeksvraag op vers weefsel moet

	<p>worden getest en dat slachthuismateriaal geen optie is. Ook wordt er gebruik gemaakt van weefsel afkomstig uit een andere proef of dieren die voor onderwijsdoeleinden zijn gebruikt, maar hieraan zitten wel beperkingen. Dieren kunnen namelijk een ziekte historie hebben die niet samen gaat met onze vraagstelling. Dit kan tot gevolg hebben dat voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag geen gebruik gemaakt kan worden van dieren afkomstig uit andere proeven. Voor elke onderzoeksvraag zullen we in kaart brengen in welke tijdsperiode een dier nodig is voor de studie. Dit hangt o.a. af van de onderzoeksvragen die ons door onze klanten (universiteiten, overheid en business partners) worden voorgelegd). Wij inventariseren dan in eerste instantie of binnen het tijdbestek waarin de studie kan worden uitgevoerd, een dier beschikbaar komt uit onderwijs of ander onderzoek. Hiervoor hebben wij een netwerk opgezet van onderzoekers in Nederland die met varkens werken. We maken nu al gebruik van een bestaande samenwerking met 1 instellingsvergunninghouder waarbij organen gedeeld worden en daarnaast zullen we, daar waar mogelijk, samenwerkingen opzetten met andere instellingsvergunninghouders om zoveel mogelijk toegang te krijgen tot restmateriaal. Alleen indien geen restmateriaal beschikbaar is zal worden overgegaan tot het aankopen van een dier. Tevens zullen we ons uiterste best doen om vraagstellingen voor de verschillende organen combineren, zodat we het beschikbare materiaal optimaal benutten. Factoren die hierbij een rol spelen zijn oa de werkzaamheid van de te testen stof en de hieraan gekoppelde uitleesparameters.</p> <p>Tot slot werken we actief aan het opzetten van een vitale humane tissue supply chain (VitalTissue.nl), waarbij het de bedoeling is dat dit zelfde type onderzoek gedaan kan worden met humane weefsels (afval materiaal uit OKs en/of afgekeurde donororganen). De pilot studies voor dit project zijn afgerond en implementatie ervan middels oprichten van de organisatie wordt voorbereid (zoeken financiering, lobbyen bij overheden en aansluiting vinden bij bestaande organisaties).</p>
Verfijning	Dieren worden voorafgaand aan de proef minimaal 7 dagen geacclimatiseerd. Indien een test stof toegediend zal moeten worden zal dit in overleg met de betrokken IVD en dierenarts plaatsvinden om het ongerief tot het minimum te beperken. Overige handelingen zullen plaatsvinden onder terminale anesthesie.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

## I. Herhaling

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

n.v.t

#### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

#### K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Organen worden geïsoleerd uit het dier

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

**Doden onder terminale anesthesie. Dit is noodzakelijk om de weefsels in goede conditie te kunnen verzamelen.**

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.