

# Advies [REDACTED]

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: *AVD 50100 2023 17240*
2. Titel van het project: *Prevention and treatment of muscle loss*
3. Titel van de NTS: *De preventie en behandeling van spierafbraak*
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: [REDACTED]
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: *21/7/2023*
  - aanvraag compleet: ...
  - in vergadering besproken: *2/8/2023 en 18/10/2023*
  - anderszins behandeld: ...
  - termijnonderbreking(en): *van 7/8/2023 tot 9/10/2023*
  - besluit CCD tot verlenging adviestermijn met max. 15 werkdagen: *n.v.t.*
  - aanpassing aanvraag: *ja, 9/10/2023*
  - advies aan CCD: *26/10/2023*
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD. *De aanvraag is afgestemd met, en heeft instemming van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *N.v.t.*
  - Datum:
  - Plaats:
  - Aantal aanwezige DEC-leden:
  - Aanwezige (namens) aanvrager:
  - Gestelde vraag/vragen:
  - Verstrekt(e) antwoord(en):
  - Het horen van de aanvrager heeft *wel/niet* geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: *7/8/2023*
  - Gestelde vraag/vragen: *zie hieronder*
  - Datum antwoord: *9/10/2023*
  - Verstrekt(e) antwoord(en): *zie hieronder*
  - De antwoorden hebben *wel* geleid tot aanpassing van de aanvraag

*De door de DEC gestelde vragen en de gegeven antwoorden:*

## **Projectvoorstel**

1. Het project omvat verschillende typen onderzoek, zowel fundamenteel als toegepast. Dit wordt in de uitwerking niet duidelijk onderscheiden, waardoor de DEC te weinig zicht krijgt op de verschillende componenten om een ethische afweging te maken. De DEC merkt hierbij op dat het fundamentele onderzoek minder uitgewerkt lijkt te zijn. Maar ook in het meer translationele onderdeel ontbreekt het onderscheid tussen pk-studies, pilotexperimenten, doseringsstudies, proof-of-concept-studies en langdurige studies. Wat komt vaak voor, wat zijn uitzonderingen? Welke aantallen dieren wilt u inzetten voor elke typen studies? Gaat u in het fundamentele deel ook bepaalde pathways onderzoeken, en zo ja, hoe verhoudt dit zich tot het meer translationele deel? Is er een logisch verband tussen deze studies, en zo, ja wat leert u in het fundamentele deel waarvan het resultaat wordt toegepast in het translationele deel? Kunt u dit weergeven in een overzicht (bijvoorbeeld een stroomdiagram met beslismomenten, zoals in 3.4.1.)? Klopt de aanname dat het translationele deel vooral contractonderzoek zal zijn en het fundamentele onderzoek vooral uit uw eigen vraagstellingen voortkomt?

Het project omvat idd zowel fundamenteel als toegepast onderzoek. De scheidslijnen hiervoor zijn niet altijd duidelijk. Ook het fundamentele onderzoek is bv gericht om het translationele aspect van het model te onderzoeken en bij toegepast onderzoek kijken we ook continu of de uitkomsten in onze modellen vergelijkbaar zijn met die in de mens. Zodra het sarcopenie onderzoeksveld een nieuwe klasse van compounds/therapieën heeft ontwikkeld, blijft het voor ons van belang om te onderzoeken wat het effect hiervan is in ons model. Dit is een continue leerproces wat ons op den duur inzicht verschaft in welke aspecten ons model translationeel is en in welke aspecten afwijkt, en daarmee voor welke klassen van interventies het model geschikt is om de effectiviteit te kunnen evalueren. Dit proces is vergelijkbaar met ons atherosclerose onderzoek waarbij we gevestigde muismodellen hebben en inmiddels >30 jaar ervaring. Desondanks, onderzoeken we ook daar bij nieuwe klassen van medicijnen voor hart- en vaatziekten nog steeds hoe ze in ons model reageren en hoe vergelijkbaar dat is met humaan. Uiteindelijk levert dit inzicht in welke klassen van medicijnen goed in ons model getest kunnen worden en welke niet. Het verschil bij het sarcopenie/frailty onderzoek is dat dit onderzoeksveld nieuwer is en we nog geen 30 jaar ervaring met ons model hebben. Om toch een wat duidelijke scheiding aan te brengen kunnen we een indeling maken in toegepast onderzoek waaronder efficacy studies en proof-of-concept studies vallen en basic/fundamenteel onderzoek die gericht zijn model optimalisatie, verfijning huisvestingcondities. Dit is nu bij 3.4.1 aangegeven en is de originele bijlage gesplitst naar bijlage 1: applied science en bijlage 2: basic science.

PK- en doseringsstudies hebben we in dit model niet gedaan en verwachten we ook niet de komende jaren en hebben we nu uit de aanvraag gehaald.

Met pilot studie wordt met name bedoeld een studie om relatief snel verschillende condities tussen elkaar af te wegen zodat we met die kennis daarna de hoofdstudie kunnen optimaliseren. Voor een pilot studie zijn dan minder dieren nodig per groep omdat deze studie nog niet gericht is op het aantonen van een statistisch significant verschil tussen de groepen.

Alle studies zijn kortdurend (2 wk acclimatisatie + 2 wk calorie restrictie (CR) en/of immobilisatie, evt gevolgd door max. 1 wk recovery) met 1 uitzondering: in de

komende jaren willen we mogelijk een tijdslijn studie doen waarbij we 1-malig de effecten van langdurige CR willen vergelijken met de kortdurende. Dit is de enige uitzondering en zal dan 1 groep betreffen die langer (8 wk) CR krijgt. Daarnaast kan ook voorafgaande aan het experiment een periode van 4 wk zitten waarin de muizen normaal chow voer krijgen waarin een tracer hoeveelheid aan <sup>14</sup>C-gelabeld eiwit is verwerkt (deze 4 wk bevatten dan de 2 wk acclimatisatie en pas bij acclimatisatie worden de muizen individueel gehuisvest). Verder kunnen ook oudere muizen gebruikt worden die eerst ouder moeten worden voordat het experiment start. Het contract onderzoek zal naar verwachting vnl efficacy studies omvatten en het fundamentele onderzoek zal idd meer gericht zijn op onze eigen vraagstellingen. Bij beiden wordt er naar pathways gekeken en naar het translationele aspect.

2. Hoe gaat u om met validatiestudies? Enerzijds lijken deze al volop te hebben plaatsgevonden, anderzijds lijken ze nog nodig. En hoe zien die eruit? Validatie studies zijn idd deels al gedaan, maar zoals hierboven ook aangegeven is dit een continu proces wat ook in de toekomst wanneer nieuwe medicijnen op de markt komen nodig zal blijven om inzicht te krijgen voor welk type interventie/klasse van medicijnen het model wel/niet geschikt is. Een validatie studie kan behandeling zijn (voeding/pharma) in een preventieve setting (gedurende de inductie van spieratrofie) of in een treatment setting (na die inductie van spieratrofie). Spieratrofie kan geïnduceerd worden door calorie restrictie/immobilisatie achterpoot of de combinatie hiervan.

Vb preventiedesign:

days of treatment	caloric restriction phase														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1) Control group, chow ad lib	x	→													x
2) Caloric restriction (60% chow) control group	x	→													x
3) Caloric restriction (60% chow/ingredient 1)	x	→													x
Matching	x														
Body weight and food intake	x			x				x			x				x
EchoMRI	x			x				x			x				x
Blood sampling: blood glucose & plasma chol, TG, protein, albumin	x							x							x
Voluntary movement during 24h												x	x	x	
Sacrifice															x
Muscle histology															x
Muscle transcriptomics															x
Muscle protein analysis															x

Vb treatment design:

days of treatment	caloric restriction phase														refeeding phase								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1) Control group, chow ad lib	x	→													→							x	
2) Caloric restriction (60% chow) control group	x															x	→						x
3) Caloric restriction (60% chow/ingredient 1)	x															x	→						x
Matching	x															x							
Body weight and food intake	x			x				x								x	x	x	x	x	x	x	x
EchoMRI	x			x				x								x				x		x	x
Blood sampling: blood glucose & plasma chol, TG, protein, albumin	x															x							x
Voluntary movement during 24h																				x	x	x	
Sacrifice																							x
Muscle histology																							x
Muscle transcriptomics																							x
Muscle protein analysis																							x

3. Dit is het vervolg van een bestaand project. Kunt u aangeven wat u gedurende dat project hebt gedaan voor welk type opdrachtgevers en het percentage waarbij de gekozen interventies hebben geleid tot verbetering van de spiermassa?  
Wij hebben nog maar een beperkt aantal interventies getest. Een groot deel van het bestaande project is uitgevoerd onder een spier-consortium wat TNO heeft opgericht en wat naast TNO verder bestond uit een universiteit, een hogeschool, een pharma bedrijf, een voedingsbedrijf, een technologisch bedrijf met speciale expertise rondom histologie en daarnaast een diëtiste. Dit onderzoek betrof vooral het opzetten van het model, vergelijken met humaan qua pathways en tot slot werden 2 interventies getest: salbutamol en ghrelin. Alleen salbutamol leidde tot verbetering van spiermassa (+13% voor gastrocnemius, +18% voor quadriceps). Daarnaast hebben we voor 1 ander pharmabedrijf en voor 2 andere voedingsbedrijven contractonderzoek gedaan. Voor het pharmabedrijf werd Actovegin (een omstreden drug, echter niet op de anti-dopinglijst) getest (geen effect op spiermassa in ons model), voor 1 voedingsbedrijf werd Vital01 (medische drinkvoeding) getest in preventie en treatment setting (verbetering spiermassa) en voor een ander voedingsbedrijf werden meerdere voedingsingrediënten getest (geen verbetering spiermassa, echter wel op de hoeveelheid eiwit in de spier).
4. U verwacht voedings-supplementen te gaan testen. Gaat het om supplementen ten behoeve van de kliniek of voor gebruik zonder doktersvoorschrift? Daarnaast wilt u ook 'stoffen' (de DEC leest: therapeutica, farmacologische stoffen) gaan onderzoeken. Kunt u aangeven om welk type stoffen dat zou kunnen gaan?  
Voor voedingssupplementen kan het zowel gaan om producten die worden voorgeschreven door dokter/diëtist (bv het door ons geteste Vital01) als supplementen zonder voorschrift (bv een over-the-counter product specifiek ontwikkeld voor vrouwen). Daarnaast ook therapeutica/farmacologische stoffen. Deze laatste kunnen zeer divers zijn, enkele voorbeelden antibodies tegen activin receptor of myostatin of drugs met als target de MAS receptor, ryanodine receptor, growth factor- $\beta$ , androgen receptor, ghrelin receptor.
5. Een DEC-lid heeft ervaring met toxiciteitsonderzoek. In dergelijk onderzoek wordt veelal gemeld dat een gewichtsverschil van 10% of meer ten opzichte van de controles leidt tot aspecifieke effecten, waardoor effecten van stoffen niet goed meetbaar kunnen zijn. Is uw model in staat om werkingsmechanismen te onderscheiden of wordt er naar aspecifieke effect van voedselrestrictie gekeken? Voorts is uit de beschrijving niet helemaal helder of er tijdens het testen van mechanismen of stoffen nog steeds sprake is van voedselrestrictie. Het lijkt erop dat dit niet (altijd) het geval is. Hieraan gekoppeld hebben wij de vraag of de effecten die worden gemeten niet enkel het gevolg kunnen zijn van de overgang van wel naar geen voedselrestrictie. Kunt u hierop reflecteren?  
Wij bekijken de werkingsmechanismen van onze te testen interventie onder 2 condities: preventiesetting=tijdens de calorierestrictie (CR) of treatment setting=na de CR. In het laatste geval wordt niet ad libitum voer gegeven, maar 100% van de individuele inname zoals vooraf gemeten. Bij beiden studie opzetten is er altijd een ad libitum controlegroep, een CR controlegroep en een behandelgroep. Door beide controlegroepen met elkaar te vergelijken, weten we het effect van CR. Door vervolgens de behandelgroep met de CR controlegroep te vergelijken, weten we het effect van de behandeling. De behandelgroep en CR controlegroep krijgen dezelfde

hoeveelheid calorieën, het on top of effect van de behandeling is daarmee onafhankelijk van de CR.

6. In 3.1, Background: hier worden verbanden gelegd die causaal lijken, maar die wellicht enkel correlaties zijn. Kunt u duidelijk maken waar u causale verbanden ziet en op grond waarvan?

Deze vraag geeft niet helemaal duidelijk aan over welke verbanden het gaat. Maar in het algemeen klopt het dat er humaan veel correlaties te vinden zijn, maar het niet altijd duidelijk is of dit ook een causaal verband is. Voor onze aanvraag is van belang dat er tussen de belangrijkste risicofactoren voor sarcopenie, nl voor malnutrition en gebrek aan exercise er wel degelijk een causale relatie is met sarcopenie, wat natuurlijk ook tot uiting komt in onze modellen, via CR en immobilisatie induceren we immers spieratrofie. Wat lastiger te definiëren is, is wat precies het verschil is tussen normale veroudering leidend tot verlies van spiermassa/functie (spierveroudering) en een pathologisch verlies (sarcopenie). Bij veel onderzoek is dit onderscheid niet duidelijk of moeilijk te maken. In samenwerking met de universiteit van Wageningen hebben we de afgelopen jaren hier aan gewerkt d.m.v. het vergelijken van een fitte oudere groep vs. ouderen met spierzwakte en de vergelijking met gezonde jongeren.

7. In 3.2, Purpose: kunt u ook bij het beschrijven van de doelen meer onderscheid maken tussen het type onderzoek (fundamenteel versus translationeel)?

Het onderzoek zouden we graag willen opsplitsen in fundamenteel vs. toegepast. Al ons onderzoek proberen we nl zo translationeel mogelijk te doen. Het toegepaste onderzoek heeft als vnl. doel om de effectiviteit van de interventie zelf te testen (op preventie of behandeling van spieratrofie). Het fundamentele onderzoek heeft als doel om de onderliggende processen beter te begrijpen en het model in lijn daarmee te verbeteren.

Deze tekst is nu aangepast in de aanvraag om dit te verduidelijken.

8. In 3.3.1, Relevance: ook hier graag onderscheid maken tussen type onderzoek en doelen.

Dit is nu toegevoegd.

9. In 3.3.1, Relevance: u verwijst naar onderzoek uit 2004. Kent u actuelere literatuur om u op te baseren? Kunt u de literatuur expliciet relateren aan uw projectbeschrijving?

Alleen voor wat betreft de inzichtelijkheid in de maatschappelijke kosten van sarcopenie verwijzen wij idd naar een onderzoek van 2004. Wij gebruiken in onze publicaties ook nog steeds deze verwijzing omdat dit artikel naar onze mening een van de betere is. Een recenter artikel komt echter op vergelijkbare kosten (19.1 billion USD) uit en hebben we nu ook toegevoegd: Goates et al., J Frailty Aging 2019, PMID 30997923.

10. In 3.3.2, Stakeholders: is wellicht ook een algemeen maatschappelijk belang relevant (volksgezondheid, productiviteit)?

Mee eens, dit hebben we nu toegevoegd.

11. In 3.4.1, Strategy (overview): u geeft in de figuur een lineaire route aan voor interventies. Is er ook sprake van terugkoppeling? Ook mist de DEC hier het fundamentele onderzoek. De figuur lijkt te gaan over het toegepaste onderzoek. Wat

zit hier nog voor? Tevens vindt de DEC termen als *target validation* en *lead validation* verwarrend. Is dit werkelijk validatie? Kunt u de begrippen uit de figuur wellicht definiëren? (En verderop: *model validation*). Hoe verhouden die zich tot elkaar en wat dragen ze bij aan het testen van interventies?

Dit is idd een wat algemener figuur wat ter illustratie is van het proces tot ontwikkeling van medicijnen/therapeutics en de rol van TNO hierbij. Het fundamentele onderzoek maakt uiteraard deel uit van het algehele discovery en development programma. Het 1<sup>e</sup> deel vindt plaats bij onze klanten en onder het figuur hebben we uitgelegd wat we hiermee bedoelen en dit plaatje geeft aan dat er vaak al een heel traject vooraf gegaan is voordat de in vivo studies bij TNO/MHR worden uitgevoerd. Zo kan er bv met een in silico approach een aantal targets geïdentificeerd worden (target ID), die vervolgens verder gevalideerd worden (target validation), bv door te kijken of modificatie van het target tot een verandering in pathologie leidt. Dit leidt vervolgens tot identificatie van leads (niet alle targets zijn geschikt voor interventie) en die lijst van leads wordt weer kleiner gemaakt d.m.v. lead validation. Bij het preclinical deel is TNO/MHR dan vaak betrokken, dat betreft dan de efficacy studies uit deze aanvraag. Er is zeker sprake van terugkoppeling, want ook als een interventie in de preclinical/clinical fase uiteindelijk faalt, is het van belang om te onderzoeken hoe dit komt en of het proces voorafgaand dan wel correct was.

De term model validation kunnen wij niet terug vinden.

12. In 3.4.2, Justification for the strategy: wat zijn de criteria om door te gaan naar een volgende stap? Wat rechtvaardigt dit doorgaan?

Wij zullen niet doorgaan met een zelfde opzet naar een volgende stap als er geen effect is. Als een pilot studie bv geen enkel effect geeft, is het niet zinvol om in dezelfde opzet vervolgens een hoofdstudie uit te gaan voeren. Het heeft ook geen zin om naar verdere mechanismes te kijken als een interventie niet effectief is.

## **Bijlage**

Algemene antwoorden en veranderingen die hierboven aan de orde zijn gesteld dienen uiteraard verwerkt te worden in de bijlage(n).

13. Door het hele projectvoorstel heen heeft de DEC moeite met de informatie over de handelingen en het ongerief. Het gaat dan om: het ontbreken van een indeling naar type onderzoek met daarbij aantallen dieren, en daarmee onduidelijkheid over wat een dier cumulatief kan overkomen. Zie ook een aantal specifieke vragen hierna. Kunt u dit een en ander grondig verduidelijken en het ongerief op een aantal punten wellicht opnieuw inschatten?

Wij hebben nu de bijlage opgesplitst in 1 voor fundamenteel onderzoek (max. n=200) en 1 voor toegepast onderzoek (max. n=800), waarbij met name de experimenten die vallen onder het toegepaste onderzoek een vaster verloop hebben zoals aangegeven in de vb schema's bij vraag 2. Er kunnen ten opzichte van bijlage 1 handelingen worden toegevoegd, maar hierbij zorgen we ervoor dat het totale ongerief moderate blijft.

14. Bij 2.A, Experimental approach: is het mogelijk de verschillende typen onderzoek beter op te splitsen? De DEC vindt het lastig een en ander te ontvlechten. Zie ook eerdere vragen.

Wij hebben de bijlages nu opgesplitst in 1 voor fundamenteel en 1 voor toegepast onderzoek. Bij beide types blijft echter dat we gebruik maken van spieratrofie geïnduceerd door calorie restrictie of immobilisatie of de combinatie hiervan. Dit kan dan of in preventie design (behandeling tijdens deze inductie periode) of in een treatment design (dan volgt een recovery periode van max. 1 wk na de inductie periode en vindt evt behandeling tijdens de recovery fase plaats). Voor het basic science gedeelte kunnen ook oude muizen gebruikt worden. De PK- en dose-finding studies hebben we nu geschrapt (zie ook vraag 1) omdat we die de afgelopen jaren ook nooit voor deze modellen hebben gebruikt.

15. Bij 2.A, Experimental approach: hoe lang zitten de muizen maximaal individueel gehuisvest per type experiment?

Muizen worden individueel gehuisvest gedurende 2 wk acclimatisatie + 2 wk CR en/of immobilisatie en dan voor de treatment design studies nog max. 1 wk recovery. Dus het gaat om 4 of 5 wk individueel huisvesten. Hierop is 1 uitzondering (zie ook vraag 1), nl het 1-malige experiment waarbij we 1 groep 8 wk CR willen geven en dus 10 wk (2 wk acclimatisatie + 8 wk CR) individueel gehuisvest zijn.

16. Bij 2.A, Experimental approach: hier heeft de IvD toegelicht dat de dieren actiever lijken dan zonder calorierestrictie. Waar schrijft u dat aan toe? Aan gezondheid? Aan honger (eten zoeken)? Anders?

De dieren zijn niet zozeer actiever, maar het patroon wordt anders: overdag bewegen de dieren idd meer dan ad libitum dieren, maar 's nachts juist weer minder. Het kan zijn dat de dieren overdag meer honger hebben en daardoor meer bewegen, maar aangezien muizen nachtdieren zijn en normaal gesproken juist 's nachts eten, is het dan wat vreemd dat ze juist 's nachts weer minder bewegen, terwijl ze dan op CR staan. Wellicht dat het circadiane ritme door de CR toch ook wordt beïnvloed. Naast licht/donker verschil, kan ook eten een stimulus zijn voor circadiane ritmiek. Dit blijft echter speculatie en kunnen we niet met zekerheid concluderen.

17. Bij 2.A, Experimental approach: hoe kijkt u qua ongerief naar de grijptest waarbij aan de staart wordt getrokken? Dit in het licht van uw hanteerbeleid zoals de IvD dit heeft toegelicht (buisshanteren om tillen aan de staart te voorkomen).

Het buisshanteren om tillen aan de staart te voorkomen, is idd een verbetering van het ongerief wat wij de laatste jaren hebben doorgevoerd. Voor de grip strength test is dit echter niet mogelijk. Omdat het dan echter om een 1-malige staartheiding gaat die alleen bij de grip strength wordt toegepast, blijft het ongerief hiervoor licht.

18. Bij 2.A, Experimental approach: bij de PK-studies is een en ander niet duidelijk. Wat gebeurt er met welke parameters? Wordt PK-onderzoek in een gezond of in een vermagerd dier uitgevoerd, en met hoeveel dieren per groep? Is het noodzakelijk satellietdieren te includeren bij PK-onderzoek in verband met de zeer frequente bloedafnamen?

Omdat we de afgelopen jaren geen enkele PK-studie in deze spieratrofie muismodellen hebben gedaan, hebben we dit nu geschrapt uit de aanvraag.

19. Bij 2.A, Experimental approach: wordt er bij proof-of-concept- en efficacy-onderzoek ook gekeken naar een aantal leefparameters? Krijgen ze op een zeker moment weer ruim voldoende voer, en wat betekent dit dan?

Het is mij niet helemaal duidelijk wat er wordt bedoeld met leefparameters. Bij proof-of-concept en efficacy studies kijken we in principe vooral naar of een bepaalde interventie een gunstig effect heeft op spieratrofie. Wel willen we nog graag een experiment uit gaan voeren om te testen of huisvesting van 2 muizen in een bak met een doorzichtig scheidingswandje een verbetering is en wat de effecten van dit

scheidingswandje dan zijn op de activiteit en corticosterone levels. Wat betreft het voer: de dieren op CR worden of na 2 wk gedood (preventiedesign) of er volgt een recovery fase van max. 1 wk (treatment design). In dat laatste geval krijgen de muizen niet ad libitum voer, maar gaan ze terug naar 100%, gebaseerd op de vrijwillige individuele voedselinname gemeten gedurende het laatste deel van de acclimatisatiefase.

20. Bij 2.A, Experimental approach: kunt u het 'pootmodel' preciezer te beschrijven? De DEC heeft er geen goed beeld bij. Ziet u bij dat model nog mogelijkheden tot verfijning?

Het pootmodel is gebaseerd op het artikel van Madaro et al., Basic Applied Myology 18 (5): 149-153, 2008. Bij het opzetten van deze methode hebben we verschillende methoden uitgeprobeerd, o.a. immobilisatie met een spalkje, met een epje over het pootje geschoven of door gebruik te maken van orthoplastisch materiaal wat na verwarmen buigzaam is, handwarm kan worden aangebracht en dan bij afkoeling hard wordt. Van alle methodes bleek de methode die we nu toepassen, nl m.b.v. zelfklevend chirurgisch verband en tape uiteindelijk het beste te werken. Hiervoor hebben we nu een uitgebreid instructie protocol opgesteld hoe het verband aan te brengen. Voor de komende tijd verwachten we geen aanpassingen aan deze methode, tenzij we in de literatuur of op congressen andere methodes tegenkomen die mogelijk beter werken.

21. Bij 2.B, De dieren: Kunt u het gebruik van een meer dan dubbel aantal dieren ten opzichte van de vorige vijfjarige periode beter onderbouwen? Kunt u onderbouwd berekenen hoeveel dieren u per type onderzoek nodig heeft en waarom zijn er bij alle studies 12 dieren/groep nodig? Kunt u dit ook uitsplitsen naar leeftijd van de dieren?

Het aantal dieren is een schatting, die voor dit onderzoek voor ons wat lastiger te maken is dan voor de andere onderzoekgebieden omdat wij nog minder lang in dit onderzoeksveld actief zijn en er gedurende de corona periode nauwelijks studies waren. We merken echter dat het spier-onderzoeks veld een groei doormaakt waarbij steeds meer bedrijven interventies ontwikkelen en er bv ook meer klinische trials gaande zijn dan 5 jaar geleden. Als we uitgaan van 2-3 applied studies per jaar en 1-2 basic studies, komen we uit op 200/jaar, is 1000 voor 5 jaar. Bij een gemiddelde efficacy study is er sprake van 5 groepen met  $n=12$  dieren per groep. Voor de groepsgrootte van de studie met ( $n=12$ /groep) is dit gebaseerd op onze ervaring met de spreiding in de resultaten en de te verwachten effecten van de verschillende behandelingen op spierverslies t.o.v. de controlegroep. Hierbij is uitgegaan van een gemiddelde standaarddeviatie/sigma van ongeveer 15% en een gewenst minimaal verschil van 20%, bij een tweezijdige toets met 95% zekerheidsinterval en een onderscheidingsvermogen van 90%. Dan kom je uit op 12 muizen per groep. Dit geldt uiteraard niet voor alle studies omdat dit aantal per groep afhankelijk is van de te verwachten effect size. Die kan per interventie verschillen. Als een pilot studie een lagere effect size aangeeft, zijn er meer muizen nodig per groep en vice versa. Voor de studies met oudere dieren hebben we inmiddels ervaring met de uitval door veroudering: bij 109 wk oude muizen was er 50% uitval bij de vrouwtjes en 25% uitval bij de mannetjes (doordat muizen spontaan dood gingen of werden gedood op basis van HEPs) bij muizen die we op 50 wk leeftijd ontvingen. Het aantal dieren per groep bij oude muizen hangt dus sterk af van de leeftijd die we willen gebruiken EN de startleeftijd waarop we de dieren kunnen bestellen en daarnaast het geslacht van de dieren en is daardoor niet 1-duidelijk op te splitsen in een tabel, maar kunnen we per specifiek experiment wel inschatten a.d.h.v. onze eerdere resultaten.

22. Bij 2.B, De dieren: Kunt u de onderbouwing qua geslacht van de dieren aanscherpen? Wanneer kiest u voor mannetjes, vrouwtjes of beide, op welke gronden? Is het misschien zo dat er bij mensen meer vrouwelijke ouderen zijn dan mannelijke, ofwel, krijgt u wel transleerbare resultaten als u enkel mannetjes gebruikt voor bepaalde



studies? Denkt u ook na over het beperken van fokoverschot wat betreft een bepaald geslacht?

Voor de studies met inductie van spieratrofie in jonge muizen d.m.v. CR en/of immobilisatie gebruiken wij mannetjes omdat deze meer spiermassa hebben dan vrouwen. Dit heeft als voordeel dat we in de mannetjes iets makkelijker een verschil in lean body mass en individuele spiermassa kunnen aantonen dan bij de vrouwtjes doordat je window net wat groter is en je ook te maken hebt met de foutmarge van je meetapparatuur (echoMRI/weegschaal). Bij de studies met oude muizen (zijn wat zwaarder/meer spiermassa) worden wel zowel mannetjes en vrouwtjes gebruikt. Wij onderzoeken momenteel de verschillen tussen mannen en vrouwen in mensen en kijken in hoeverre de oude mannetjes muizen en vrouwtjes muizen deze reflecteren. Echter hebben we ook aangetoond dat het CR/immobilisatie model beter de humane spierversoudering weergeeft dan verouderende muizen, dus verwachten we in die zin dat de resultaten meer transleerbaar zijn met dit model dan met oude mannetjes/vrouwtjes muizen. Wij denken zeker na over het fokoverschot. Bij dit specifieke spier onderzoek gebruiken we echter liever mannetjes bij de korte inductiestudies. Voor andere onderzoeksdoeleinden zullen wellicht de vrouwtjes weer bij voorkeur worden gebruikt. Om deze zelfde reden gebruiken we voor sommige basic pilot studies bv ook de ApoE\*3Leiden of ApoE\*3Leiden.CETP-mannetjes (met name de vrouwtjes worden daar voor atherosclerose onderzoek gebruikt, waardoor er eerder mannetjes overblijven).

23. Bij 2.D, Pain and compromised animal welfare: hier mist de DEC 'compromised welfare' dat u eerder en ook bij F wel beschrijft. Hebben de muizen mogelijk honger? Indien er sprake is van genetisch gemodificeerde muizen, hebben deze intrinsiek ongerief door de genetische aanpassing?

Ja, de muizen op CR hebben mogelijk honger. Dit is nu toegevoegd. De genetisch gemodificeerde muizen hebben geen enkel intrinsiek ongerief door de genetische aanpassing.

24. Bij 2.E, Humane eindpunten: zijn er voor oude muizen, die allerlei ouderdomskwalen kunnen krijgen, wellicht specifieke eindpunten nodig?

Ja, dat klopt, voor de oudere muizen gebruiken we ook specifieke eindpunten. Die zijn nu toegevoegd.

25. Bij 2.F, Classification: kunt u hier nog eens kritisch naar kijken, bijvoorbeeld naar frequenties (een PK-studie met maximaal 3 bloedmonsters lijkt niet reëel), fenotype als gevolg van ouderdom en of genetische modificatie, maximale duur experiment inclusief hersteltijd? En kunt u dan ook het cumulatieve ongerief vermelden per type experiment, eventueel voor een paar concrete, representatieve voorbeelden? De DEC heeft bijvoorbeeld twijfels bij uw inschatting van wekenlange individuele huisvesting. Wij hebben nu de bijlages opgesplitst in 2 bijlages, 1 voor toegepast en 1 voor basic science. Bij de toegepaste studies zullen we met name de studies met inductie van spieratrofie in jonge WT muizen dmv CR en/of immobilisatie gebruiken, maar willen we de ApoE\*3Leiden en ApoE\*3Leiden.CETP muizen en oude muizen niet helemaal uitsluiten. Voor de basic studies kunnen alle modellen gebruikt worden, en zal de opzet mogelijk eerder wat afwijken, afhankelijk van de vraagstelling. De PK-studies hebben we nu uit de aanvraag gehaald. Voor wat betreft fenotype door veroudering hebben we de humane eindpunten hiervoor nu toegevoegd bij 2E. De studievoorbeelden bij vraag 2 kunnen als concrete representatieve voorbeelden worden beschouwd. De tabel bij 2F geeft allerlei procedures aan die mogelijk hieraan kunnen worden toegevoegd, maar zeker niet allemaal tegelijk. De duur van de experimenten en maximale individuele huisvesting hebben we bij vraag 1 en 15 toegelicht en zal alleen bij 1 experiment in 1 groep langer zijn, maar schatten wij toch nog steeds als moderate en niet severe in.

26. Bij 2.G, 3Rs: Ondanks uw uitgebreide toelichting waarom vervanging niet mogelijk is, is de DEC nog niet overtuigd. (De link naar de eerste *whitepaper* werkt overigens niet.) Er is veel onderzoek naar versterking van spieren door beweging en voeding, wat getest wordt bij bijvoorbeeld ziekenhuispatiënten. Waarom zijn er dan toch muizen nodig?

De hyperlink naar het 1<sup>e</sup> whitepaper is nu aangepast. Het is idd mogelijk om bewegingsinterventies, maar ook sommige voedingsinterventies gelijk in mensen uit te voeren. Niet alle voedingsinterventies mogen echter gelijk in mensen worden getest en dat geldt helemaal voor pharma interventies. Alleen als er bv bekend is dat er geen safety issues zijn. Bij de humane studies kan er niet altijd een biopt worden afgenomen (zeker bij oudere verzwakte personen met weinig spiermassa is het niet altijd mogelijk om een biopt te nemen) en is het ook lastiger om de condities te standaardiseren (andere dieetcondities, onderliggende ziektes en medicijngebruik speelt met name bij ouderen een belangrijke rol). De muizen ontvangen allen hetzelfde chow dieet en krijgen geen andere medicatie waardoor ze geschikter zijn voor de mechanistische studies waarbij in het spierweefsel wordt gekeken welke pathways worden beïnvloed.

#### **NTS**

27. Wilt u overwegen voor "diermodel" een ander trefwoord te zoeken? Elke NTS in het systeem betreft immers een diermodel. De term is niet onderscheidend.

Wij hebben de term diermodel nu vervangen door spierveroudering

28. De nadelige gevolgen voor de dieren zijn nauwelijks beschreven. Kunt u deze informatie verder aanvullen?

We hebben nu bij *expected impacts/adverse effects on the animals* aangevuld dat de CR en de individuele huisvesting een matig ongerief geeft en dat ook oude muizen gebruikt kunnen worden die ongerief kunnen hebben die bij veroudering hoort.

29. Vervanging: in hoeverre hebt u nagedacht over mogelijkheden proefdiervrije deelexperimenten? Hebt u nagedacht over of literatuuronderzoek gedaan naar vervangende alternatieven? Zie ook vraag 26, maar ook de leek (de lezer van de NTS) is hierin geïnteresseerd, denkt de DEC.

Ja, wij willen idd de mogelijkheden verder onderzoeken om bepaalde deelvragen in proeven zonder proefdieren (in vitro) uit te testen. Ook doen wij veel in silico onderzoek door gebruik te maken van bestaande databases. Voor specifieke deelvragen is het nl idd mogelijk om in vitro onderzoek te doen. Ook is het in sommige gevallen mogelijk om de interventie gelijk in mensen te testen. De onderzoeksvragen waarvoor dit niet geldt, vallen onder deze aanvraag.

30. Verfijning: kunt u voorbeelden geven van verfijning die u toepast?

Een voorbeeld wat eerder al ter sprake kwam is het buishanteren van de muizen i.p.v. via de staart. Specifiek voor deze aanvraag hebben wij eerder getest of het mogelijk is om de muizen overdag in groepen te huisvesten en alleen 's nachts individueel. Dat leverde echter meer stress (=hogere corticosterone levels op) en hebben we niet doorgevoerd. Ook hebben we getest of het mogelijk is om de muizen ook loze calorieën (via calorieloze gel) aan te bieden. Dit was echter ook geen succes, de muizen aten er niet van en het werd alleen een vieze smurrie in de kooi. Hoewel dus niet al onze pogingen succesvol waren, geeft dit wel aan dat wij continue nadenken over mogelijke verfijningen en deze proberen te implementeren. Voor de komende periode willen we graag de mogelijkheden onderzoeken om de muizen individueel te huisvesten met 2 muizen in 1 kooi m.b.v. een doorzichtige wand. Hierbij willen we kijken wat het effect is op corticosterone levels en op de activiteit. Wij hebben deze tekst nu deels toegevoegd aan de NTS.

31. Levensstadia: wanneer en waarom kiest u voor jonge, volwassen en oude muizen (en hoe oud dan)?

Het merendeel van de studies is met jong/volwassen muizen. Dit betreft b.v. de applied studies waarbij we het effect van een interventie willen testen. De oude muizen worden alléén gebruikt als de vraagstelling naast spieratrofie ook het verouderen zelf betreft. Juist om de effecten van normale veroudering te kunnen vergelijken met de inductie via calorie restrictie/immobilisatie hebben we oude muizen vergeleken waarbij we leeftijden hebben gebruikt van 17, 21 en 25 maanden. Juist door de verschillende modellen met elkaar te vergelijken, krijgen we meer inzicht in de onderliggende processen voor veroudering en spieratrofie.

Tot slot attendeert een DEC-lid u op enkele mogelijke tikfouten in uw dossier (s.v.p. zelf nagaan waar ze staan):

- Group housing during caloric restriction phase **is required** since otherwise the most dominant animal of the cage would eat all diet available and other animals of the same cage would starve
- For muscle atrophy studies, male mice were used in previous experiments using young mice with muscle **induction** via caloric restriction and/or immobilization, since male mice are slightly heavier with more lean body mass and muscle mass than female mice
- Referentie De Jong et al., Aging Disease. **2021** [-> 2023?], PMID: 37191430.

Deze teksten zijn nu aangepast.

Toelichting vanuit de IvD naar aanleiding van vragen van de DEC over inschatting van het ongerief, een alternatief voor het veroorzaken van vermindering van spiermassa, de huisvesting en humane eindpunten.

*"Als IvD zijn we het eens met de inschatting van het ongerief zoals dit is gemaakt door de onderzoeker. De calorische restrictie leidt weliswaar tot gewichtsafname en hongergevoel, maar de dieren zijn actief en levendig en ontwikkelen geen ziekteverschijnselen ten gevolge van de verminderde voedselinname. Een inschatting van dit ongerief als ernstig lijkt ons dan een te hoge inschatting, zeker in relatie tot andere experimenten zoals bijv. reumatoïde artritis of kankeronderzoek waarbij de dieren afvallen maar ook zeer veel pijn hebben. Een inschatting van dit ongerief als matig lijkt ons dan ook beter passen te bij deze procedure.*

*Voor de immobilisatie van de poot zijn er verschillende alternatieven de revue gepasseerd, waaronder bv. zenuwinactivatie met bv. botox. Ook hebben we informeel contact gehad met andere instituten waarbij er andere methoden zijn besproken om de spierafbraak te bewerkstelligen. Naar aanleiding van deze gesprekken zijn we nog meer overtuigd dat de huidige methode met het intapen van de poot de meest optimale methode is, zowel vanuit het dierenwelzijn als de translationele waarde van het model. In dit geval heeft het dier de standaard kooiverrijking en kan het dier nog vrij door de kooi heen bewegen, ontstaat de spierafbraak vrij snel (2 weken) en is er de mogelijkheid om de spieren van de ingetapete poot te vergelijken met de vrije poot. Ook hier zijn we het eens met de inschatting als matig ongerief van deze methode.*

*Het individueel huisvesten schatten (tot 10 weken) schatten we ook als matig in. Dit mede gezien het feit dat het voornamelijk mannetjes dieren betreft en omdat de dieren in open kooien gehuisvest worden waardoor ze elkaar wel kunnen horen en ruiken. Met de zorgvuldigheid van zowel de onderzoekers als de proefdiertechnici en de beschreven eindpunten zie ik ook geen risico dat het cumulatief ongerief meer dan matig zal worden.*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): N.v.t.

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

- Datum expert advies
- Advies expert

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. *Het project is vergunningplichtig. Het gaat om dierproeven in de zin der wet.*
2. De aanvraag betreft een *nieuwe aanvraag*.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? *De DEC is competent om hierover te adviseren.*
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. *Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van behandeling van de aanvraag. Wel is een selectie gemaakt uit het totale aantal leden op grond van de wettelijk en ethisch benodigde expertises voor een goede afweging. Deze werkwijze (een extra brede DEC met een selectie van leden per dossier) is afgestemd met de CCD.*

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. *De aanvraag is na het beantwoorden van de vragen en het aanpassen van de aanvraag toetsbaar en heeft voldoende samenhang. De aanvrager beschrijft de problematiek van spierverslies door verschillende (medische) oorzaken en de gevolgen, en heeft hiervoor een model ontwikkeld waarin farmaca en voedingssupplementen die dit verlies zouden kunnen compenseren door herstel van spiermassa, onderzocht kan worden. Hier wil men zelf onderzoek naar doen, maar het ontwikkelde model ook als CRO kunnen aanbieden om zodoende middelen te kunnen testen die de verloren spiermassa kunnen herstellen. Daarnaast wil men het proces bestuderen (fundamenteel wetenschappelijke vraag). De afgelopen 5 jaar hebben de onderzoekers ook met het model gewerkt en het verbeterd. De onderzoekers geven aan dat zij in die periode nog maar een beperkt aantal interventies hebben getest. Dat onderzoek betrof vooral het opzetten van het model, vergelijken met de humane situatie qua biologische pathways, en tot slot werden 2 interventies getest. Een daarvan leidde tot verbetering van spiermassa. Daarnaast is er voor 1 ander farmabedrijf en voor 2 andere voedingsbedrijven contractonderzoek gedaan. Men verwacht de komende periode meer aanvragen voor onderzoek. Na vragen van de DEC heeft de aanvrager de bijlage opgesplitst in twee bijlagen die de beide deelvragen beter omschrijven. Ook is er een heldere, navolgbare matrix opgenomen waarin helder is gemaakt hoe verschillende vragen beantwoord kunnen worden. De IvD heeft op verzoek van de DEC toegelicht hoe het model nu is opgezet met de verbeterde methoden en de inschatting van het ongerief. Het is de DEC niet duidelijk of het onderzoek zich uitsluitend beperkt tot middelen die een medische toepassing hebben (patiënten / oudere mensen), of dat er additioneel ook sprake zou kunnen zijn van een niet medische toepassing (b.v. onderzoek naar additieven voor sportdranken).*
2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in

de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

*Er is geen sprake van tegenstrijdige wetgeving voor zover de DEC bekend.*

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

*De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën (zowel fundamenteel als toegepast en translationeel onderzoek) sluiten aan bij de hoofddoelstelling om bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelmethoden. Dit is ook toegelicht door de aanvrager in het antwoord op vraag 1 van de DEC.*

*Belangen en waarden*

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

*Het directe doel is om vragen van opdrachtgevers op dit gebied te kunnen helpen beantwoorden en de mechanismen van spierverlies beter te begrijpen. Het uiteindelijke doel is om spierverlies bij patiënten te verbeteren.*

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

*Wij geven hierbij een overzicht van de belangen in willekeurige volgorde, nog zonder prioritering of weging.*

<b>Morele waarden</b>	<b>Welzijn</b>	<b>Autonomie</b>	<b>Rechtvaardigheid</b>
<b>Belanghebbenden</b>			
<i>Proefdieren (muizen)</i>	<i>Geen pijn Geen stress Gezondheid Geluk</i>	<i>Natuurlijk gedrag Bewegingsvrijheid</i>	<i>Intrinsieke waarde Integriteit Geen instrument zijn</i>
<i>Patiënten en familie</i>	<i>Gezondheid</i>	<i>Bewegingsvrijheid Bewegingskracht Zelfstandigheid</i>	
<i>Gezonde mensen</i>	<i>Kunnen sporten</i>	<i>Controle over conditie</i>	<i>Kans om te winnen</i>
<i>Vergunninghouder</i>	<i>Economisch belang</i>	<i>Onderzoek doen</i>	<i>Concurrentiepositie</i>
<i>Klantbedrijven</i>	<i>Economisch belang Efficiëntie (selectie)</i>	<i>Onderzoek doen</i>	<i>Concurrentiepositie</i>
<i>Onderzoekers</i>	<i>Interessant werk</i>	<i>Onderzoek doen Vooruitgang boeken</i>	<i>Kans op succes</i>
<i>Biotechnici</i>	<i>Interessant werk Welzijn, geen stress</i>	<i>Onderzoek (helpen) doen</i>	
<i>Samenleving</i>	<i>Goede economie Geen zieken Zelfstandigheid</i>		

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

*Neen, er zijn geen effecten op het milieu beschreven en de DEC heeft geen reden hierover te twifelen.*

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.  
*De kennis en kunde zijn voldoende gewaarborgd. Het instituut heeft zeer veel ervaring op dit gebied, zowel wetenschappelijk als voor de benodigde proefopzet en de uitvoering van de beoogde experimenten, hetgeen uit hun gevestigde naam en diverse publicaties blijkt.*
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.  
*Het project sluit aan bij de doelstelling: men induceert eerst spierverslies in een muis en onderzoekt vervolgens of bepaalde middelen dit spierverslies kunnen voorkomen of herstellen/bevorderen. De uitleesparameters (o.a. biologische, met imaging, post mortem) zijn erop gericht deze beoordeling te ondersteunen. Wel valt op voor de pilotstudies dat er geen duidelijke gegevens zijn over de opzet: wat betreft aantallen dieren, groepsindeling en specifieke handelingen.*

#### *Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe.  
*Er is geen sprake van een of meerdere van onderstaande categorieën.*
- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e, lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV-richtlijn (13c, lid 3)
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.  
*De vraag is door de onderzoekers beantwoord met nee. Er is sprake van individuele huisvesting voor maximaal 8 weken, hetgeen goed is onderbouwd. Daarnaast is er sprake van een forse calorie- (voer)beperking die noodzakelijk is om het verlies van spiermassa te veroorzaken. Daarnaast is er sprake van tijdelijke immobilisatie door 1 poot in te tapen.*
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

*Het cumulatieve ongerief is realistisch ingeschat. Voor elke handeling in combinatie met frequentie en duur is het ongerief ingeschat en daarna het cumulatieve ongerief vastgesteld. De DEC heeft de IvD om toelichting gevraagd, vooral over de voedselbeperking en de solitaire huisvesting, en heeft na beantwoording geen reden om het ongerief anders in te schatten.*

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.  
*De integriteit van het dier wordt aangetast door handelingen om verlies van spiermassa te induceren (immobilisatie poot, beperkt voer, extra moeten bewegen) en door diverse invasieve handelingen, zoals het toedienen van farmaca, het afnemen van bloed en het doden van het dier. Daarnaast zouden de farmaca / additieven ongewenste bijwerkingen kunnen veroorzaken.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.  
*De humane eindpunten zijn goed gedefinieerd in bijlage 1, en worden in minder dan 1% verwacht. Criteria zijn o.a. verlies in lichaamsgewicht en abnormaal gedrag. Ook in bijlage 2 zijn de humane eindpunten goed beschreven, ook de kenmerken die bij (sterke) veroudering horen. De DEC is echter van mening dat de <1% waarbij dit zou kunnen optreden sterk onderschat is, en schat dit zelf op 10%.*

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.  
*De aanvrager stelt dat de ontwikkeling van spierverlies een complex multifactorieel (meerdere factoren) proces is dat zich ontwikkelt in de tijd, en dat dit proces niet alleen de spier beïnvloedt, maar ook de stofwisseling van het hele organisme (door de interactie tussen de verschillende organen). Dat erkent de DEC. De vraag of het noodzakelijk is om deze interactie tussen de verschillende organen te kunnen bestuderen met behulp van proefdieren leverde een discussie op. Sommige interventies kunnen direct in mensen worden getest; dit project betreft dus de interventies of vraagstellingen waarvoor dit niet geldt. Het nabootsen van spierafbraak in los gekweekte cellen van één orgaan geeft inzicht in een (beperkt) aantal lokale processen, maar geeft geen compleet beeld van de relevante fysiologische processen, zoals interactie tussen organen, energiemetabolisme en aanpassingsvermogen. Deze modellen zijn daarom minder geschikt voor fundamenteel en toegepast onderzoek naar de effectiviteit van nieuw geteste interventies, maar kunnen voor specifieke deelvragen ingezet worden. Daarnaast worden bepaalde deelvragen onderzocht door onderzoek te doen in bestaande databases online. Uiteindelijk kan de DEC zich wel vinden in de onderbouwing omdat voordat men interventies in mensen gaat onderzoeken, wel bekend moet zijn wat mogelijke bijwerkingen of schadelijke effecten zijn.*
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.  
*Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Bij het opzetten van nieuwe studies wordt gebruik gemaakt van gegevens uit eerdere dierproeven. Hierdoor wordt bepaald wat de optimale groepsgrootte voor een nieuwe studie is. Uitgangspunt zal*

*zijn om met een minimale hoeveelheid dieren de voorgelegde onderzoeksvraag eenduidig te kunnen beantwoorden. Ook zal waar dat kan het aantal benodigde dieren worden verminderd door bv studies te combineren, waardoor dezelfde controlegroep gebruikt kan worden.*

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

*De muizen ontwikkelen spierafbraak die vergelijkbaar is met die in de mens. Omdat dezelfde biologische processen ook plaatsvinden bij de mens, is de muis geschikt om bij vraagstellingen waarvoor een compleet organisme nodig is, deze processen te kunnen bestuderen. Men zal zoveel mogelijk verfijning toepassen bij het uitvoeren van studies, zodat het ongerief van de dieren zoveel mogelijk beperkt wordt. Zo is in het instituut b.v. het hanteren aangepast naar het aanbieden van een plastic buis (i.p.v. het optillen aan de staart) en zal men voor de komende periode onderzoeken of het mogelijk is om de muizen individueel te huisvesten met 2 muizen in 1 kooi en met een doorzichtige scheidingswand.*

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

*Duplicatie is niet van toepassing.*

*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.

*Er zullen bij studies waarvoor jonge dieren noodzakelijk zijn alleen mannetjes worden gebruikt, omdat die meer spiermassa hebben, waardoor effecten duidelijker zullen optreden. Dit is naar de mening van de DEC een goede onderbouwing (gegeven bij vraag 22 van de DEC). Het onderzoek in oude(re) dieren zal in beide geslachten worden uitgevoerd.*

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

*De dieren worden in het kader van het project gedood omdat men post mortem ook de spieren verder wil bestuderen.*

20. Indien dieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. *N.v.t.*

*NTS*

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

*De NTS is na kritische vragen van de DEC een evenwichtige weergave van het project geworden, en is begrijpelijk geformuleerd. De DEC heeft de aanvrager geattendeerd op een aantal tekortkomingen, die zijn hersteld.*



## D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

*De centrale morele vraag is weegt het onderzoek naar werkzaamheid van farmaca/voedseladditieven die de ontwikkeling van spiermassa bevorderen voor patiënten met cachexie of sarcopenie het onderliggende mechanisme op tegen het matige ongerief van 1.000 muizen?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoetgekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

*De DEC waardeert het belang van de betrokken proefdieren waarbij de morele waarden in het geding zijn als reëel. De commerciële belangen van de ontwikkelaars (farmaca en additieven) worden gewaardeerd als zijnde van nauwelijks enig belang. De belangen van patiënten / ouderen waardeert de DEC als reëel: zij kunnen immers door de ziekte of door de ouderdom niet of moeilijk hun spieropbouw bevorderen door voldoende lichaamsbeweging, en zijn juist zeer gebaat bij meer spieropbouw, omdat zij daardoor meer stabiliteit en bewegingsvrijheid kunnen opbouwen of behouden. Dit geldt ook voor toepassing bij ernstige (bijvoorbeeld kanker) of chronisch ziekten waarbij de kwaliteit van leven verbeterd wordt. De onderzoekers hebben een belang om meer kennis te vergaren en te publiceren, maar dat waardeert de DEC als van geringe waarde. De waarde voor de samenleving om ervoor te zorgen dat patiënten bijvoorbeeld sneller uit het ziekenhuis kunnen worden ontslagen en op een productieve wijze deel kunnen nemen aan de samenleving ziet de DEC als hoog.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag.

*De morele vraag is: weegt het onderzoek naar middelen die spieropbouw bevorderen en de kennis over de achterliggende mechanismen op tegen het matige ongerief van 1000 muizen? De belangrijkste belanghebbenden zijn de patiënten en ouderen die een reëel belang hebben om door farmaca of additieven spieropbouw te bevorderen en zo hun stabiliteit en hun kwaliteit van leven te verhogen. Ook de samenleving heeft een groot belang, bijvoorbeeld omdat de toepassing van de middelen kan leiden tot een reductie van de kosten voor de gezondheidszorg. De onderzoekers hebben de kennis en de middelen (faciliteiten) om het onderzoek naar effectiviteit te kunnen uitvoeren. Het diersmodel is een geïnduceerd model waarin spierafbraak wordt bevorderd door voederbeperking, extra beweging of het beperken van het gebruik van een ledemaat. Dieren moeten deels solitair worden gehuisvest. Onderzoekers hebben veel kennis en ervaring. Zij geven aan dat eerder onderzoek in de afgelopen 5 jaar relevante kennis en gegevens heeft opgeleverd. Echter, de DEC betwijfelt of dit al veel concreets en echt bruikbaar heeft opgeleverd. De DEC heeft ook besproken of dit onderzoek niet a priori in mensen kan worden uitgevoerd. Onbekend is echter of de middelen een potentiële bijwerking hebben waaraan men patiënten beter niet kan blootstellen. Daarnaast zijn grote cohorten nodig om effectiviteit aan te tonen van een middel waarvan b.v. de meest passende dosis nog niet bekend is. Patiënten die door ziekte of operaties te kampen hebben met spierafbraak zijn soms niet in staat om dit door meer beweging te herstellen. Oudere patiënten worden instabiel en door een betere spieropbouw kan b.v. vallen worden voorkomen (inclusief secundair letsel als een heupfractuur met kans op een dodelijke afloop). De DEC heeft gediscussieerd of ook onderzoek naar middelen die in sportdrinkjes kunnen worden toegevoegd om spieropbouw te bevorderen onder de aanvraag zouden kunnen vallen, of voor mensen die goede spieropbouw wensen en daar weinig inspanning voor willen doen. Daar is*

geen uitsluitel over te geven. Er is geen beslisboom opgenomen waarin de aanvrager laat zien selectief te zijn in het aannemen van opdrachten voor onderzoek. De DEC kan de centraal morele vraag of het onderzoek voor patiënten en ouderen opweegt tegen het matige ongerief van de proefdieren wel beantwoorden met een ja, maar niet voor eventueel onderzoek naar middelen voor niet-medische doeleinden, zoals b.v. sportdrankjes om in gezonde personen meer spieropbouw te bevorderen. De reden voor het oordeel van de DEC over dit laatste is dat gezonden mensen wel alternatieven hebben, zoals vooral: meer bewegen.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten:
  - De voorwaarde dat de vergunninghouder alleen middelen onderzoekt met een medische toepassing voor patiënten die geen spieropbouw kunnen bevorderen door meer inspanning te verrichten en voor het fundamentele onderzoek dat onderbouwing kan geven voor dit soort middelen.*
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

- ### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn.
- Het advies is op grond van een meerderheidstandpunt tot stand gekomen. 5 van de 7 leden stemmen in met een positief advies met daarbij de aantekening dat het positieve advies alleen geldt voor middelen met een medische toepassing voor patiënten die zelf geen spieropbouw meer kunnen bevorderen door meer inspanning te verrichten, en voor het fundamentele onderzoek dat onderbouwing kan geven voor dit soort middelen. De overige 2 leden geven een negatief advies. Eén lid met het minderheidsstandpunt "negatief advies" maakt de volgende afweging. Spierverlies is een vervelende aandoening die inderdaad (zie D3) instabiliteit en vallen kan veroorzaken, met soms ernstige gevolgen. Ook zou dit onderzoek er in potentie voor kunnen zorgen dat bedlegerige patiënten sneller opknappen en weer een goed leven kunnen leiden en eventueel productief worden. Dit is een groot belang. Daar staat tegenover dat 1.000 muizen matig ongerief hebben en de dood vinden. Dit is voor mij een preciaire balans. Wat de negatieve doorslag geeft is het volgende. Er zijn al meerdere bestaande interventies, zoals aangepaste voeding en aangepaste fysiotherapie (bijvoorbeeld speciale oefeningen voor bedlegerigen). De noodzaak van dit onderzoek in combinatie met de verwachte beperkte opbrengst acht ik laag. Die beperkte opbrengst is helaas een schatting, maar staat wel in het licht van de eveneens beperkte opbrengst van een vergelijkbaar project van de afgelopen jaren. Het doen van het onderzoek weegt dan niet op tegen het matige ongerief van 1.000 dieren.*

*Een tweede lid met het minderheidsstandpunt "negatief advies" maakt de volgende afweging. De muizen die gebruikt worden in de studies ontwikkelen spierafbraak die vergelijkbaar is met die in de mens. Omdat dezelfde biologische processen ook plaatsvinden bij de mens, is de muis geschikt om deze processen in een compleet organisme te kunnen bestuderen. Echter, voor dit lid is het onduidelijk of de compound(s) reeds op functionaliteit getest zijn in cellijnen van de te gebruiken muizen stam(men). De te testen compound(s) zijn meest waarschijnlijk gebaseerd op humane receptor/ligand-interacties. De beperkte structurele homologie mens/muis kan het nut van de dierproeven beperken. Beter inzicht in de analoge functionaliteit Muis vs. mens, idealiter back-to-back in in-vitro studies op cellijnen, is van groot belang.*

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.

*De DEC heeft gediscussieerd over de toepassing van de te onderzoeken interventies. Er wordt uitdrukkelijk beschreven dat het zou gaan om patiënten na b.v. een operatie en oudere patiënten die geen mogelijk hebben op andere wijze het spierverslies te compenseren. Het gebruik van middelen om spieropbouw te stimuleren in gezonde personen is weliswaar binnen bepaalde groepen personen (b.v. bodybuilders, sporters) maatschappelijk aanvaard, maar het is ethisch niet aanvaardbaar dat daarvoor dierproeven worden uitgevoerd. Doordat het een zogenaamde 'koepelaanvraag' betreft, zijn de typen stoffen die zullen worden onderzocht en de concrete toepassingen daarvan onbekend.*

*Een ander besproken dilemma is de noodzaak en de te verwachten opbrengst van het onderzoek. Hierover waren de standpunten in de DEC verdeeld. Zie ook vraag 2 hierboven.*

*Ook is gesproken (en zijn er vragen gesteld) over het welzijn van de muizen in het licht van de voedselbeperking en de solitaire huisvesting. Het is erg moeilijk in te schatten wat dit daadwerkelijk voor de muizen betekent en of de categorie 'matig ongerief' passend is. Hierachter heeft echter iedereen zich uiteindelijk geschaard.*