



	<b>Dossier: AVD1150020173566</b>	
		<b>Aanwezig</b>
<b>1</b>	<b>NTS</b>	<b>X</b>
<b>2</b>	<b>Aanvraagformulier</b>	<b>X</b>
<b>3</b>	<b>Projectvoorstel</b>	<b>X</b>
<b>4</b>	<b>Bijlage beschrijving dierproeven</b>	<b>X2</b>
<b>5</b>	<b>DEC-advies</b>	<b>X</b>
<b>6</b>	<b>Ontvangstbevestiging</b>	<b>X</b>
<b>6.1</b>	<b>Evt. Vragen CCD aan aanvrager</b>	<b>X</b>
<b>6.2</b>	<b>Evt. antwoorden aanvrager</b>	<b>X</b>
<b>7</b>	<b>Beschikking en vergunning</b>	<b>X</b>
<b>8</b>		
<b>9</b>		
<b>10</b>		



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Een niet invasieve ablatie therapie door middel van ultrageluid
1.2 Looptijd van het project	4 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Ablatie, vaatlijden, hoge intensiteit gefocust ultrageluid

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Recent heeft onze onderzoeksgroep een techniek ontwikkeld waarbij gebruik wordt gemaakt van gefocust ultrageluid met een hoge intensiteit om bepaalde weefsels te behandelen. Door de hoge intensiteit op een specifiek punt te richten, wordt het weefsel in dat punt verhit en sterft af. Het apparaat dat voor deze techniek wordt gebruikt plaatsen we op de huid. Daarna kunnen we, net als met echo, in het weefsel kijken. Vervolgens kan met hetzelfde apparaat, op dezelfde plaats, een weefselbeschadiging worden gemaakt in dieper gelegen weefsels. De beschadigingen die we met deze techniek maken zijn erg nauwkeurig en kunnen heel precies worden gestuurd omdat hetzelfde apparaat dat wordt gebruikt om te branden, ook wordt gebruikt voor beeldvorming.</p> <p>Bij patiënten met vaatlijden zorgen kalk en vet voor vernauwing aan de binnenkant van de bloedvaten, waardoor het bloed niet goed meer kan stromen. Voor patiënten met ernstig (perifeer) vaatlijden zijn lang niet altijd</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>goede behandelmethoden beschikbaar. Dit zijn operaties waarbij een omleiding van de bloedvaten wordt gemaakt en als ook dat niet mogelijk is dan moet de patiënt zelfs een amputatie ondergaan. Door de wand van het bloedvat te behandelen met de hier boven beschreven techniek denken wij vordering van de vernauwing kan worden gestopt of zelfs (gedeeltelijk) kan verdwijnen.</p> <p>Een andere patiëntgroep die mogelijk kan worden behandeld met de nieuwe techniek zijn patiënten met een hoge bloeddruk. Een hoge bloeddruk verhoogt de risico's op hart- en vaatziekten, maar is lang niet altijd met medicatie te behandelen. Een mogelijke behandeling voor deze patiënten is het beschadigen van het regelcentrum van de bloeddruk, welke zich bevindt in en rondom de halsslagader. Wij denken dat deze patiënten kunnen worden geholpen door dit regelcentrum te beschadigen met behulp van de hierboven beschreven techniek.</p> <p>Voordat we deze techniek in patiënten kunnen gebruiken moeten er nog meer onderzoeken gedaan worden om zeker te weten dat de techniek veilig kan worden gebruikt. Daarnaast zal er onderzoek gedaan worden naar de effectiviteit van de behandelingen.</p> <p>Ook moet klinisch personeel worden getraind om ervoor te zorgen dat ze de apparatuur veilig en goed kunnen gebruiken.</p>
3.2	<p>Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?</p> <p>We verwachten dat binnen 1.5 jaar na de start van dit project de eerste patiënten met perifeer vaatlijden behandeld kunnen gaan worden met de nieuwe techniek.</p> <p>Voordat het zover is moeten we nog een aantal onderzoeken doen om zeker te weten dat de weefsel rondom het doelgebied, maar bijvoorbeeld ook de huid niet beschadigd raken. Daarnaast gaan we onderzoeken wat de beste instellingen zijn om een optimale behandeling te kunnen doen. Met deze techniek kunnen de patiënten zonder grote, risicovolle operatie worden behandeld.</p> <p>Voor de behandeling van hoge bloeddruk gaan we eerst kijken naar de veiligheid van de methode, voordat we meer onderzoek kunnen doen naar de effectiviteit. Door deze methode hoeven patiënten mogelijk minder of geen medicijnen meer te gebruiken, waardoor het aantal bijwerkingen zal verminderen.</p>
3.3	<p>Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?</p> <p>Voor de onderzoeken gebruiken we varkens omdat deze qua grootte en anatomie goed overeen komen met mensen. We verwachten dat er in de komende 5 jaar maximaal 280 varkens nodig zullen zijn.</p>
3.4	<p>Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?</p> <p>Alle onderzoeken vinden plaats onder volledige narcose, hierdoor ervaren de dieren tijdens de behandeling geen pijn. Eventueel ongerief zal worden behandeld met pijnmedicatie en/of andere relevant medicatie.</p>
3.5	<p>Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?</p> <p>46%: Terminaal experiment 36%: Matig ongerief 18%: Ernstig ongerief</p>
3.6	<p>Wat is de bestemming van de dieren na afloop?</p> <p>Na de onderzoeken zullen de dieren worden gedood, zodat het behandelde weefsel kan worden onderzocht.</p>

## 4 Drie V's

#### 4.1 Vervanging

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

In dit onderzoek kijken we onder andere naar langetermijneffecten. Hierbij spelen vele lichaamsprocessen een grote rol. Dat kunnen we niet anders testen dan in levende dieren. Ook omdat we het precieze effect op de doelweefsels niet op een andere manier kunnen onderzoeken zijn dierproeven vereist. Na de behandeling nemen we het weefsel uit en onderzoeken we het onder de microscoop, dat kan niet met menselijk weefsel.

#### 4.2 Vermindering

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Alle gebruikte methoden testen we eerst uitvoerig in wiskundige modellen en slachthuismateriaal voordat we ze in dieren onderzoeken. De resultaten uit voorgaande proeven zullen worden gebruikt om een zo nauwkeurig mogelijke inschatting te maken van het aantal benodigde dieren. Ook zetten we de proeven zodanig op dat er meerdere testen tegelijk kunnen plaatsvinden waardoor er in totaal minder dieren nodig zijn.

#### 4.3 Verfijning

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Bij deze experimenten maken we gebruik van varkens, omdat die qua grootte en anatomie goed vergelijkbaar zijn met de mens.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Voor de ingreep zullen wij de dieren in groepen huisvesten, inclusief kooiverrijking. Na de ingreep zullen de dieren alleen worden gehuisvest vanwege medicatie toediening, hierbij zitten de dieren wel naast elkaar in een grote ruimte zodat zij contact met soortgenoten kunnen onderhouden. Hiernaast zullen de dieren altijd geopereerd worden onder narcose in steriele omstandigheden. Na de operaties krijgen de dieren pijnstilling om het ongerief te verminderen. De dieren zullen altijd onder volledige narcose worden gedood.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	30244197
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Postdoc
		Afdeling	Cardiologie
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |  |                                                            |
|-----------------------------|--|------------------------------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters |  | <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 - 12 - 2017
- Einddatum 1 - 12 - 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- High Intensity Focussed Ultrasound for non-invasive ablation therapy
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Een niet invasieve ablatie therapie door middel van ultrageluid
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de Instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

U. K. C. C. C.

02-10-2017



## Form Project proposal

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

### 1 General information

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

---

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

---

1.3 Provide the title of the project.

High Intensity Focussed Ultrasound for non-invasive vascular ablation therapy

### 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.

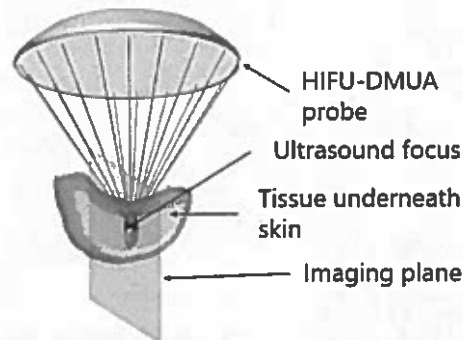
- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is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

#### High Intensity Focussed Ultrasound

High intensity focussed ultrasound (HIFU) therapy is based on ultrasound beams that are partially converted into thermal energy when they travel through tissue. At low intensities, such as diagnostic



ultrasound, this phenomenon does not interfere with normal physiology. However, at higher intensities, which can be achieved by focussing multiple ultrasound beams at a single point (**Figure 1**), a local high temperature increase can be realized, leading to coagulation necrosis.



**Figure 1** Schematic overview of HIFU technique showing the focusing of multiple ultrasound beams in a single location, leading to tissue heating.

#### **Current applications of HIFU**

Over the past decades, this technique has evolved from a promising idea to an FDA approved treatment for symptomatic uterine fibroids in 2004. Other registered treatments with HIFU include those for prostate cancer, thyroid nodule and several neurological disorders such as essential tremor, neuropathic pain and parkinsonian tremor. Furthermore, HIFU has been successfully applied in treatment of cancer to destroy solid tumours of the bone, brain, breast, liver, pancreas, rectum, kidney, testes, prostate. {Aubry, J.F. 2013; Jolesz, F.A. 2005; Hynynen, K. 1993; Ikink, M.E. 2013}

To ensure controlled therapy delivery on precisely the desired location, HIFU should be performed using image guidance. Image guiding with HIFU procedures can be performed with several imaging modalities such as diagnostic echo imaging, magnetic resonance imaging (MRI) or X-ray imaging. Using MRI as the guiding technology adds the possibility to perform temperature monitoring during the HIFU applications to avoid excessive tissue heating. Although the current application of MRI guided HIFU (MR-HIFU) is very suitable for previously described indications, it is unfit to target lesions that require a high spatial precision, such as atherosclerotic plaques.

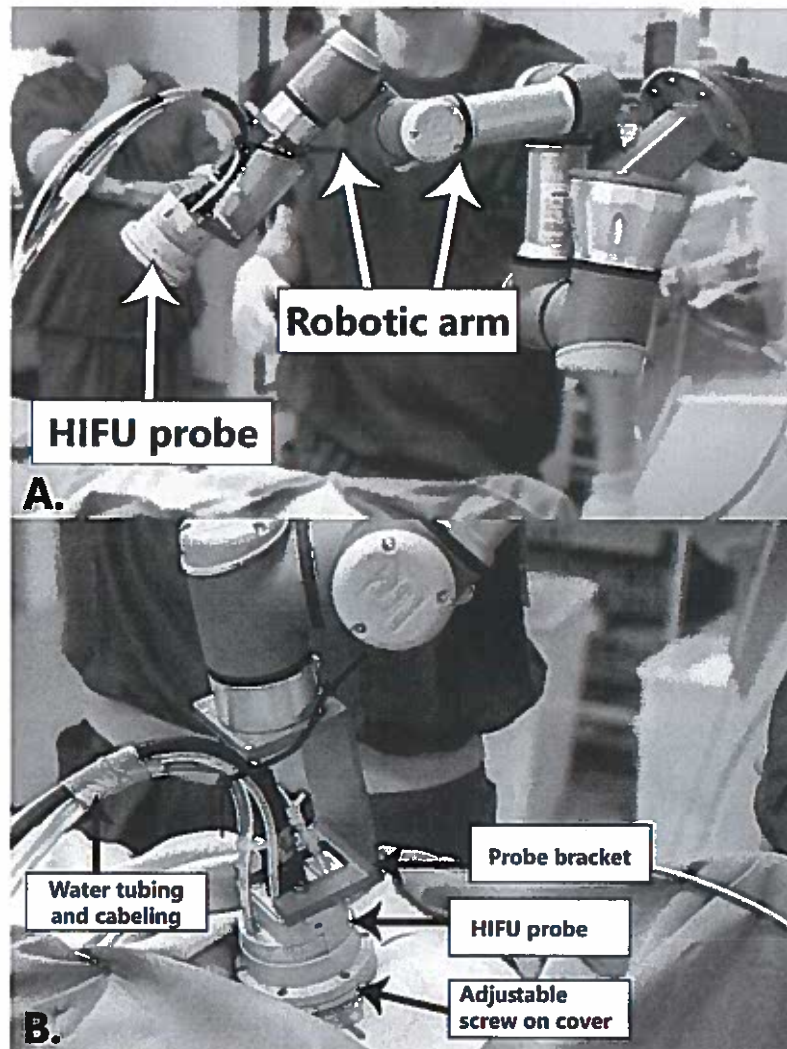
#### **HIFU DMUA system**

More recently, the dual-mode ultrasound array (DMUA) Synthesizer™ HIFU system was developed as a stand-alone alternative to MR-HIFU. The HIFU-DMUA system is capable to perform minimal invasive percutaneous imaging and therapy in one system using a single 3.5 MHz ultrasound probe (**Figure 2**).

The system allows creation of thermal lesions with sub-millimetre dimensions at a depth (from the skin) of 1-4 cm. Moreover, the incorporated closed-loop feedback monitors the immediate and spatially-accurate feedback on the tissue response to the therapeutic HIFU beams, and automatically adapts the HIFU exposure to produce the desired lesion size while avoiding overheating. This capability allows the operator to produce volumetric lesions with uniformity and high therapeutic gain. {Liu, D. 2010; Casper, A. 2012; Bayat, M. 2014} In the current setup, the DMUA probe is attached to a 6-degrees of freedom robotic arm (**Figure 2A**) that enables accurate targeting on predefined locations to optimize the procedural efficacy.

In summary, the new DMUA - HIFU system offers:

- Imaging and therapy using the same probe
- Non-invasive therapy (percutaneous)
- A closed loop control system to prevent tissue overheating
- A robotic arm to allow accurate targeting and therapy
- An alternative for MR-HIFU



**Figure 2** The DMUA-HIFU mounted on the robotic arm. **A.** Overview of 6-joints robotic arm with the HIFU probe attached to the distal end. **B.** HIFU probe mounted on the robotic arm with a bracket. To ensure proper contact with the skin surface, an screw on cover is positioned over the concave shaped HIFU probe. Degassed water is circulated through the space between the probe and the cover.

#### *Disadvantages of the DMUA-HIFU system*

The current DMUA-HIFU device has several limitations. The sphericity of the face of the HIFU probe (**Figure 1**) determines the location of the focal point. Small alterations ( $\sim 1$  cm in all directions) to the exact focal point can be accomplished by adjusting the relative phases of the elements in the array. Additionally, the screw on cover of the probe (that ensures optimal contact; **Figure 2B**) can be adjusted to vary the distance between probe and the skin. Even though many adjustments can be made to steer the focal point, the depth of the target must be  $\sim 1-4$ cm, measured from the skin.

Furthermore, HIFU energy is partially absorbed by bones between the probe and the target area. In the thoracic region the ribs may prevent successful ablation of for example the liver. Therefore, if the target area is located behind bones, additional precautions need to be taken to prevent heating of the bones and to ensure proper energy deliver to the target tissue.

### **Previous studies with precursor DMUA-HIFU system**

Previous preclinical studies have investigated the safety and feasibility of the DMUA HIFU therapy using an early version of the system. The targeting of peripheral vessels in an adult swine model confirmed the abilities of the real-time DMUA imaging to achieve fine control of the lesion formation process and tissue ablation with a high level of precision and minimal collateral damage. {Casper,A.J. 2013} Follow-up research demonstrated the feasibility and safety of targeting atherosclerotic plaques in four swine, three of which were familial hypercholesterolemia swine. {Shehata,I.A. 2013} All swine tolerated the procedure well, without any vascular complications. Histology confirmed that HIFU ablation therapy delivery resulted in necrotic lesions with associated inflammatory infiltration in the treated atherosclerotic plaques. The endothelium overlying the targeted arterial segments remained intact. Follow-up research including a total of 17 animals (15 familial hypercholesterolemia and 2 domestic swine) confirmed these findings, achieving successful HIFU delivery in all animals (evidence of lesion formation obtained either through histology or intravascular ultrasound). No adverse events or vascular complications were observed during the longer-term follow-up of this study. In addition, an in vivo experiment in four Watanabe rabbits (genetically disposed to develop atherosclerosis) and two New Zealand rabbits were treated with the DMUA imaging with real-time controlled lesion formation, demonstrating the ability to identify 2-mm target vessels and the added value of the real-time imaging feedback on the uniformity of the produces lesions.

In the previously described studies, atherosclerotic (large) animal models have been used to demonstrate successful ablation of soft atherosclerotic plaques. In patients, peripheral atherosclerotic plaque are usually calcified (hard). Before transitioning the HIFU therapy to a clinical study, the effects of this HIFU therapy on hard plaques needs to be study. To the best of our knowledge, no large animal models with such plaques exist. One of the studies in the present proposal is aiming at investigating the effect of HIFU therapy on these hard plaques using a plaque xenotransplantation model.

### **Clinical background**

In this proposal we target two different diseases, in both, the target area is comparable, namely the vascular wall or structures very close to it.

#### ***Atherosclerosis***

Peripheral arterial disease (PAD), caused by atherosclerosis in the peripheral arteries, is an important health care problem. The medical management of symptomatic PAD consists of secondary risk reduction, exercise training and eventually percutaneous or surgical intervention. {Hankey,G.J. 2006; Vahl,A.C. 2005;} Although exercise rehabilitation programs have been shown to significantly improve symptoms and walking ability, the ankle-brachial index is unaffected and interventional treatment is eventually needed in a large proportion of patients. {Lane,R. 2014;}

The results with the currently available interventions are initially acceptable, but limited on the longer term by a 5-year patency of femoropopliteal stenosis of 40-60% after percutaneous transluminal angioplasty (PTA) and 65-80% after femoropopliteal bypass surgery. {Gallagher,K.A. 2011; Acin,F. 2012;} Repeated intervention of a recurrent stenosis may prolong patency, but the application of these procedures is limited. In addition, these interventions are invasive procedures, carrying an associated risk of complications. Complication rates of PTA are around 7%, including access site related complications (groin haemorrhage, pseudo-aneurysm, wound infection), acute renal failure (related to the use of radiographic contrast), thromboembolic complications and, rarely, arterial rupture. {Gallagher,K.A. 2011; Becker,G.J. 1989; Gardiner,G.A.,Jr 1986; Brancaccio,G. 2012;} Moreover, interventions for PAD are associated with a 0.4% (for PTA) to 2.2% (for femoropopliteal bypass surgery) peri-operative mortality rate. {Klinkert,P. 2004; Gallagher,K.A. 2011;}

The growth dynamics of atherosclerotic plaques that entail neovascularization and buildup of lipid-rich core suggest that a plaque may respond to localized thermal therapy. A noninvasive form of thermal therapy, with HIFU, capable of producing thermal necrosis within the plaque and the vasa vasorum while preserving the overlying endothelium may introduce a new approach to interfere with the progressive growth of atherosclerotic plaques. {Shehata, I.A. 2013} Heavily calcified tissue, such as bones or calcified plaques, absorbs ultrasound waves, and thus energy. We hypothesize that calcified atherosclerotic

plaques will absorb the delivered HIFU energy and will subsequently vaporized or broken down. {Siegel, R.J. 1988} Studies that use vaporize plaque using laser ablation, do not show signs of distal embolization.

### **Hypertension**

Hypertension is an important risk factor for developing multiple cardiovascular diseases. Almost 30% of the human population suffers from hypertension, while in approximately 50% of these patients the blood pressure cannot be controlled accurately with medication and almost 15% of these patients are resistant to medication therapy. {Go, A. 2014; Carey, RM. 2013}

Previous studies have focused on the sympathetic nervous system as a target for treatment for hypertension, since this system is important for the maintenance of hypertension. {Oparil, S. 2015; Esler, M. 2000; Smith, P. 2004} Denervation of the carotid body nerves (located at the bifurcation of the carotid artery) might be a possible method to control hypertension. {Abdala, A. 2012}

Previous studies have focused on the sympathetic nervous system as a target for treatment of hypertension, since this system is important for the maintenance of hypertension. {Oparil, S. 2015; Esler, M. 2000; Smith, P. 2004} The carotid body (located at the bifurcation of the carotid artery) contains both baroreceptors and chemoreceptors, which influence both blood pressure and respiratory function by activating the sympathetic nervous system. {McBryde, F. 2017} In hypertensive patients, the sympathetic activity is increased. {Smith, P. 2004; Abdala, A. 2012} Previous studies suggested deactivation of the carotid body may decrease sympathetic activity and therefore blood pressure. {McBryde, F. 2013; Sinski, M. 2014; Abdala, A. 2012; Nakayama, K. 1961} However, other studies showed no difference in blood pressure and remain critical about the potential complications or carotid body deactivation. {Johnson, B. 2013; Narkiewicz, K. 2016} Some limitations of the previous studies might explain the opposite findings, e.g. deactivation of the carotid body by hyperoxia resulted in a transient BP decrease, implying hyperoxia is not effective for long term carotid body deactivation {Sinski, M. 2014}. Also some studies focused on unilateral carotid body deactivation, while bilateral carotid body deactivation might be more appropriate.

Studies that have performed carotid body deactivation by physical denervation, show a positive effect in the majority of the treated patients. {Narkiewicz, K. 2016} Surgical removal of the carotid body is a complex invasive procedure. The new DMUA-HIFU system allows for percutaneous precise targeting of the carotid body, thereby lowering the risks associated with an invasive procedure.

In pigs, the carotid body is located in the bifurcation of the carotid artery, the same position as in humans. In previous experiments, we were able to stimulate the carotid body and thereby influence blood pressure. We could clearly visualize and identify the carotid bifurcation with our conventional echo machine. Thereafter, we positioned a quadripolar linear catheter in situ and started stimulating while monitoring blood pressure. In resting state, the blood pressure was approximately 160/110mmHg. We were able to decrease the blood pressure to 110/70mmHg during stimulation of the carotid body. Upon stopping stimulation, a blood pressure increase to (160/110mmHg was observed. We successfully repeated this procedure and saw the same pattern (decrease while stimulating, increase to baseline thereafter). With this experiment we have demonstrated a method to assess carotid body ablation (if the carotid body is ablated, no drop in blood pressure will occur upon stimulation).

In this research project, we investigate the safety and feasibility of carotid body denervation by HIFU ablation in a porcine model.

### **This study proposal**

Several studies have already investigated the use of the system for the treatment of PAD, mainly focussing on histological parameters. Before a clinical introduction of the DMUA-HIFU system is possible, several key questions will have to be answered.

All previously described preclinical studies have been performed using an early version of the system. In the that system all components were not integrated in one system. In the new system, that will be used in experiments listed in this research proposal, all separate components have been combined in one device, which will also be used for clinical studies later on. Additionally, a robotic arm has been added to

the system to optimize therapeutic accuracy. The equipment has been evaluated in different *in vitro* settings. The accuracy of lesion formation and the robotic arm were evaluated using *ex vivo* slaughterhouse materials.

The current study will focus on the safety, feasibility and efficacy of HIFU therapies with the new system with a focus on clinically relevant parameters. The safety will be assessed by evaluating the occurrence of unintentional damage to surrounding tissues or the skin surface during HIFU applications to the target area of the vascular wall. The feasibility and efficacy of using the HIFU device for the therapies described in this proposal will be evaluated by assessing the capability of the system to ablate the target tissue without unacceptable side effects. Clinically relevant parameters to assess the feasibility and efficacy include, but are not limited to: occurrence of unintentional damage, skin redness/burn, (peripheral) blood flow, blood pressure, inflammation.

We expect that the HIFU therapy for atherosclerosis using the DMUA-HIFU system can be evaluated in a clinical safety and feasibility study within 1.5 years after the start of this project.

### 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?

In this research proposal we are looking to evaluate the safety, feasibility and efficacy of two applications of the HIFU-DMUA system in combination with the robotic arm. The goals have been separated into 2 different lines of research, based on different clinical applications:

1. Investigate HIFU for (peripheral) vessel disease (acute, short (1-4 days) and long term (1-8 weeks))
  - a. Safety
    - i. Effect of HIFU on tissues surrounding blood vessels
    - ii. Effect of HIFU on skin
  - b. Feasibility and efficacy
    - i. Investigate the required energy for successful ablation of the arterial wall
    - ii. Investigate the required number of lesions for successful ablation of the arterial wall
    - iii. Investigate the safety and feasibility of ablation of a (transplanted) plaque
  - c. Train clinical personnel to perform this procedure with the system
  - d. Use the HIFU system for in a clinical safety and feasibility study within 1.5 years after the start of this project
2. HIFU for treatment of hypertension (acute and long term (3-6 weeks))
  - a. Safety and feasibility (acute)
    - i. Investigate the feasibility of HIFU ablation of the carotid body
    - ii. Investigate the safety of (bilateral) HIFU ablation of the carotid body
  - b. Safety and feasibility (long-term)
    - i. Investigate the long- term feasibility of HIFU ablation of the carotid body
    - ii. Investigate the long- term safety of (bilateral) HIFU ablation of the carotid body
  - c. Train clinical personnel to perform this procedure with the system

### Feasibility of the project

In the current planning, HIFU for peripheral artery disease (purpose 1) will make an introduction into clinical practise within 1.5 years after the start of this project. For successful realisation of this plan, several preclinical studies addressing safety, feasibility and efficacy will have to be performed.

The research group involved in this study is comprised of multiple experienced vascular surgeons, cardiologists, technical physicians and technicians. Furthermore, the original designer of the HIFU DMUA system and the manufacturer are closely involved to maximize study success. All experiments will be

performed in a licensed animal research laboratory which enables excellent research quality because of a well-trained experienced staff and available equipment.

### 3.3 Relevance

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

There are several diseases for which the current technical treatment options are inadequate, either because the current techniques are suboptimal or because suitable techniques do simply not exist.

#### **Purpose 1: HIFU for the treatment of peripheral arterial disease**

Peripheral arterial disease (PAD), caused by atherosclerosis in the peripheral arteries, is an important health care problem that not only affects Western populations, but has become a global problem. PAD prevalence ranges from approximately 5% in patients aged below 49 years to over 18% in patients older than 85 years in high-income countries, with slightly lower prevalence rates in the other WHO regions. {Fowkes, F.G. 2013} Atherosclerosis in the arteries of the abdomen and lower extremities limits the arterial blood flow to the muscles of the lower extremities, leading to intermittent claudication. If left untreated, symptoms can progress to chronic pain, non-healing wounds, ulceration, gangrene and eventually limb loss. {Ouriel, K. 2001;} Due to the functional limitations related to intermittent claudication, health-related quality of life is severely affected in these patients. {de Graaff, J.C. 2002;} In addition, PAD poses a social and economic burden, caused by disability, inability to work, hospitalization and comorbidity. Atherosclerosis is rarely restricted to the peripheral arteries and morbidity and mortality is high in PAD patients. In a cohort of 16,440 PAD patients, 9.7% experienced a stroke, 9.5% had a myocardial infarction and 48.5% had died within an average of 6 years follow-up after the diagnosis of PAD. {Caro 2005;}

If proven safe and effective, the DMUA-HIFU system may prevent lesions from causing stroke in symptomatic and asymptomatic patients and eliminate the need for hospitalization, general anaesthesia of the patient and the occupation of an operating room and its personnel, thus reducing risks and financial costs for a population of patients with PAD.

#### **Purpose 2: HIFU for treatment of hypertension**

Hypertension is an important risk factor for developing multiple cardiovascular diseases. Almost 30% of the human population suffers from hypertension, while in approximately 50% of these patients the blood pressure cannot be controlled accurately with medication and almost 15% of these patients are resistant to medication therapy. {Go, A. 2014; Carey, R.M. 2013}

Previous studies have focused on the sympathetic nervous system as a target for treatment of hypertension, since this system is important for the maintenance of hypertension. {Oparil, S. 2015; Esler, M. 2000; Smith, P. 2004} Previous research suggested deactivation of the carotid body caused decrease in blood pressure, for patients with hypertension. {McBryde, F. 2013; Sinski, M. 2014; Abdala, A. 2012; Nakayama, K. 1961}

With the HIFU system, ablation of the carotid body can be performed percutaneously, thereby lowering the risks associated with invasive surgical procedures. Preclinical studies are necessary to confirm that the HIFU system is capable of irreversible carotid body ablation, without (severe) complications.

If proven safe and feasible, carotid body deactivation can be used for patients with drug-resistant hypertension. Also patients with other sympathetically mediated diseases are a potential target, e.g. patients with heart failure, chronic kidney disease, insulin resistance and end-stage renal disease. {Paton, J. 2013}

#### **Scientific relevance**

The research performed within this project will pave the way for other research into new treatment strategies with the HIFU setup used in this project, but also for HIFU based therapies in general. The HIFU setup in subject in this research proposal might be suitable for the treatment of various types of

cancer.

### **3.4 Research strategy**

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

The HIFU system will first be used for the treatment of patients with peripheral artery disease. Therefore, the primary focus of this research proposal is on the experiments that pave the way for this therapy (purpose 1). In a parallel fashion, options for the treatment of hypertension (purpose 2) will be investigated.

##### **Purpose 1: HIFU for the treatment of peripheral arterial disease**

In the experiments described in attachment 1 (type 1) of this project proposal we focus on the safety, feasibility and efficacy of the treatment of PAD with the HIFU DMUA system. Furthermore to enable a clinical introduction, the clinical staff will be trained in using the system for this purpose. Research within this experimental type will be performed in a sequential fashion, allowing the use of previously obtained results to optimize the next experiment, thereby increasing the value of results. The first focus of the experimental type will be PAD in the femoral artery, as the first clinical trial will involve patients with this type of PAD. Subsequently we will investigate the treatment of other vessels that may be affected by plaque formation. Due to a difference in location, properties and surrounding tissues the targeting of other vessels was defined as a separate experimental subtype.

The planned clinical introduction of HIFU therapy for PAD, ~1.5 years after the start of this project, might raise several issues or questions or give new insights. To accommodate these issues and questions, it is possible that more preclinical studies need to be performed. Examples of such issues may for example be undertreatment of the plaque (due to a too low dose), in such a case higher dose therapies need to be evaluated for safety in a preclinical model. Furthermore, a novel design of the HIFU probe (to for example target deeper vessels) may require a preclinical evaluation of safety, feasibility and efficacy. Additionally, during the years following the clinical introduction of this therapy, clinical staff need to be trained.

##### **Purpose 2: HIFU for treatment of hypertension**







The experiments described in attachment 2 (type 2) of the project proposal are primarily focussed on the safety and feasibility of this procedure. In an acute porcine model, the feasibility of carotid body ablation will be investigated. By electrical stimulation of the carotid body while monitoring blood pressure, the functionality of the carotid location will be assessed. Histological analysis will be performed to assess damage to surrounding tissues such as nerves and muscles. To assess whether the ablations are permanent, a study with follow-up will be implemented.

The efficacy of the treatment is NOT a subject of the current research proposal, therefore a hypertensive animal model is not required.

##### **Overall**

Research within this project will be combined wherever possible. Acute experiments will be combined whenever possible. Furthermore, in the model with follow-up described in type 1, we can perform acute studies described in type 2 during the terminal experiment and visa versa. Combining experiments will significantly decrease the total number of used animals (reduction of 20-45%).

			Year	0	1				2				3				4					
			Objective	Type	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4		
Research proposal																						
Atherosclerosis		1.a	1.1.a																			
			1.1.b																			
		1.2.a	1.2.a																			
			1.2.b																			
		1.3.a	1.3.a																			
			1.3.b																			
		1.b	1.1.b																			
			1.2.b																			
		1.c	1.1.c																			
			1.2.c																			
	Clinical safety and feasibility study	1.d																				
	Clinical efficacy study																					
Hypertension		2.a	2.2.a																			
			2.2.b																			
	Clinical safety and feasibility study																					

	= Period of current research proposal
	= Planned animal experiments
	= In vitro/Ex vivo preparations
	= Possible experiments after clinical findings
	= Possible experiments due to new insights
	= Planned clinical studies

**Figure 3** Overall planning of the experiments. If experiments can be combined to reduce the total number of required animals, some experiments might be performed at a different time than shown here.

### 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.

With the HIFU system, the inflicted lesion size is sub-millimeter and the optimal depth of therapy is 2-5cm from the skin surface. For the experiments described in this project, we require animals sized comparable to humans. In previous experiments a porcine model was used. The anatomy of these animals (60-75kg) is similar to humans, enabling an optimal possibility for translation from the preclinical research to clinical practise.

#### Purpose 1:

1. Ablation of the femoral artery
  - a. *Acute experiment:* Acute experiments will be performed to investigate the acute physiological (blood pressure and flow) and histological (damage to nerves, muscles and skin) effects of HIFU therapy.
  - b. *With follow-up:* The long term effects will be studied in these experiments. Several effects will only be visible after a certain amount of time has passed, e.g. the process of fibrosis formation requires >2 weeks. Furthermore, physiological effects require time to stabilize.
  - c. *Training:* Before a clinical introduction of the HIFU system, the clinical staff needs training
2. Ablation of other arteries or veins
  - a. *Acute experiment:* Acute experiments will be performed to investigate the physiological (blood pressure and flow) and histological (damage to nerves, tissues and skin) effects of HIFU therapy.
  - b. *With follow-up:* The long term effects will be studied in these experiments. Several



effects will only be visible after a certain amount of time has passed, e.g. the process of fibrosis formation requires >2 weeks. Furthermore, physiological effects require time to stabilize.

c. *Training:* Before a clinical introduction of the HIFU system, the clinical staff needs training

### 3. Ablation of transplanted arterial plaque

a. *Feasibility of transplantation:* transplantation of a human plaque (or blood vessel containing a plaque) is a complex procedure. In this experimental type this procedure will be optimized to ensure a solid model that can subsequently be used to evaluate HIFU therapy.

b. *Transplantation with therapy:* all other experiment focus on the safety, feasibility and efficacy of the HIFU treatment in healthy vessel (due to the existence of a good atherosclerotic large animal model that produces human like plaques). In this experiment the animal's femoral artery will have a human like plaque, enabling evaluation of the HIFU therapy in circumstances that closely matches the clinical situation.

In purpose 1.2 (ablation of other vessels) the target vessel will be determined based on several properties:

- distance to skin (should be in the range of HIFU probe as described in 3.1)
- size (should be clearly distinguishable imaging)
- clinical relevance (is the vessel affected in patients with atherosclerosis)
- clinical feasibility (is treatment of these vessels possible in patients)

Multiple vessel can be targeted in one animal, this greatly reduces the total number of required animals (20-30%). Targeting of multiple vessels in one animal can be considered if:

- the effects do not interfere with each other
- the distance between the targets is greater than 2cm (to prevent overlap)
- the discomfort does not increase

### Purpose 2:

#### 1. Ablation of the carotid body

a. *Acute experiment:* Acute experiments will be performed to investigate the acute physiological (blood pressure and flow) and histological (damage to nerves, tissues and skin) effects of HIFU therapy.

b. *With follow-up:* The long term effects will be studied in these experiments. Several effects will only be visible after a certain amount of time has passed, e.g. the process of fibrosis formation requires >2 weeks. Furthermore, physiological effects require time to stabilize.

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.

All described components/experimental types are performed with the new HIFU-DMUA robotic arm system. The target area of both purposes is the same, namely the arterial wall or directly adjacent structures. Therefore, results obtained within both experimental types are interchangeable in terms of safety, feasibility and efficacy. For example results from the experiment described in type1 will be used to optimize the experimental design of type 2 experiments. The effects on surrounding tissue found during type 1 experiments may be prevented in subsequent type 1 experiments and in type 2 experiments.

### Purpose 1:

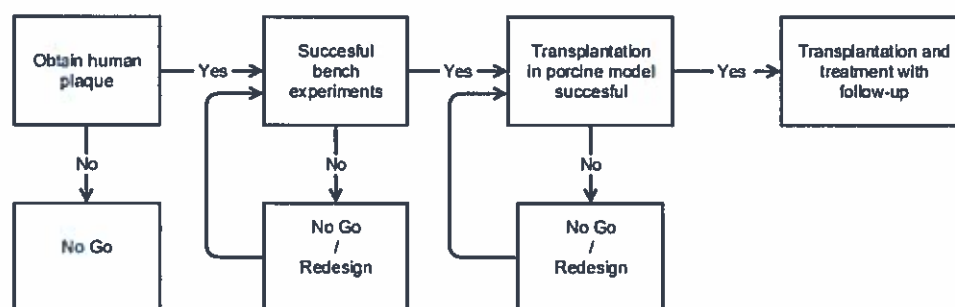
**Milestone 1:** perform the acute and short term safety and feasibility experiments, to verify that the surrounding tissue and the skin remain unaffected after the artery is ablated successfully.

**Milestone 2:** perform the long term safety and feasibility experiments, to verify that the surrounding tissue and the skin remain unaffected after the artery is ablated successfully.

**Milestone 3:** perform the training of clinical staff.

The experiments for the different milestones will be performed in sequential fashion for one target area (e.g. femoral artery). If a milestone cannot be accomplished we will not proceed (NO GO) to the next milestone if the causes cannot be mitigated.

For the proposed experimental type 1.3 (plaque transplattation), the GO/NO GO structure is defined more specifically, as shown in figure 4.



**Figure 4** GO/NO GO structure for experiment type 1.3.

**Purpose 2:**

**Milestone 1:** perform the acute safety and feasibility experiments, to verify that the surrounding tissue and the skin remain unaffected, after the carotid body is ablated successfully. The animal tolerates the bilateral carotid body ablation.

**Milestone 2:** perform the long term safety and feasibility experiments, to verify that the surrounding tissue and the skin remain unaffected, after the carotid body is ablated successfully. The animal tolerates the bilateral carotid body ablation.

Experiments under milestone 2 of purpose 2 will only be performed after successful completion of milestone 1 (GO/NO GO)

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	HIFU for (peripheral) vascular disease
2	HIFU for treatment of hypertension
3	
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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	HIFU for (peripheral) vascular disease

*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.

Atherosclerotic plaque predominantly arise in arteries, but may also be found in veins. Acute experiments (1a & 2a) offer the possibility of directly measuring the effect (e.g. vessel diameter and histology (inflammation)) of the applied therapy, without the need for long term follow-up. In the experiments with follow-up (1b & 2b) the short term effects (e.g. vessel diameter or inflammation) as well as the long term effects (e.g. vessel diameter, lesion size, vessel wall histology) can be studied. From previous experiment we know that short term follow-up of 2-4 days will reveal histological inflammatory responses and longer term follow-up will allow for lesion maturation (1-4 weeks) and long term follow-up will allow for assessment of tissue response (e.g. formation of fistula).

In experiment 3a the feasibility of the transplantation of a human arterial plaque (or section of an artery containing a plaque) will be investigated. The transplantation is a complex procedure performed by a vascular surgeon. No large animal models are available that produce large human-like plaques. Therefore, human plaques will be used, this approach is however complex bearing in mind the challenges encountered with the process of grafting or transplanting organs or tissues between members of different species. Therefore, in a first study, the feasibility of this method will be investigated. An inflammatory response (if present) will occur immediately after transplantation. 1-3 days after transplantation this response is expected to be fulminant, offering the best option for histological analysis. After 2-4 weeks the effects of an inflammatory response (if present) should have decreased and the physiological (blood flow) situation stabilized. At this timepoint, assessment of physiological parameters can be performed.

In experimental design 3b, the effect of HIFU therapy on arterial plaques will be assessed physiologically and histologically. The therapy will be delivered after the physiology in the transplanted area has

stabilized (results from study 3a). The immediate effect of the therapy on local physiology will be assessed directly and 1h after therapy. The long term physiological effects of the therapy are expected to be clearly visible 4 weeks after therapy. At that point in time, physiological parameters will be assessed and the animal will be euthanized for histological analysis. b) the short term effects (e.g. vessel diameter or inflammation) c as well as the long term effects (e.g. vessel diameter, lesion size, vessel wall histology). From previous experiment we know that short term follow-up of 2-4 days will reveal histological inflammatory responses and longer term follow-up will allow for lesion maturation (1-4 weeks) and long term follow-up will allow for assessment of tissue response (e.g. formation of fistula).

## **Structured description of experiments**

### **1. Ablation of the femoral artery**

#### **a. Acute experiment**

In this experiment ablations with the HIFU-DMUA-robotic arm system will be performed on the femoral artery. On the same day, all relevant *in vivo* measurements will be done, subsequently the animals will be euthanized to assess histology.

#### **b. With follow-up**

In this experiment on day 0 ablations with the HIFU-DMUA-robotic arm system will be performed on the femoral artery. Then, after either 2-4 days or 1-4 weeks of survival, all relevant *in vivo* measurements will be done, subsequently the animals will be euthanized to assess histology.

#### **c. Training**

In this session, clinical staff will be trained to use the HIFU-DMUA-robotic arm system for the ablation of the femoral artery.

### **2. Ablation of other arteries or veins**

#### **a. Acute experiment**

In this experiment ablations with the HIFU-DMUA-robotic arm system will be performed on arteries or veins not in the inguinal region. On the same day, all relevant *in vivo* measurements will be done, subsequently the animals will be euthanized to assess histology.

#### **b. With follow-up**

In this experiment on day 0 ablations with the HIFU-DMUA-robotic arm system will be performed on arteries or veins not in the inguinal region. Then, after either 2-4 days, 1-4 weeks or 2 months of survival, all relevant *in vivo* measurements will be done, subsequently the animals will be euthanized to assess histology.

#### **c. Training**

In this session, clinical staff will be trained to use the HIFU-DMUA-robotic arm system for the ablation of the femoral artery.

### **3. Ablation of transplanted arterial plaque**

#### **a. Feasibility of transplantation**

In this experiment, on day 0, a human excised femoral plaque will be transplanted to the femoral artery of the animal. Subsequently, all relevant *in vivo* measurements will be done to assess physiological changes. After 1-3 days or 4-8 weeks, the same physiological parameters will be assessed and the animal will be euthanized. The artery will be excised for histological assessment.

#### **b. Transplantation with therapy**

In this experiment, on day 0, a human excised femoral plaque will be transplanted to the femoral artery of the animal. Subsequently, all relevant *in vivo* measurements will be done to assess physiological changes. After the physiological situation has stabilized (4-8 weeks), the same physiological parameters will be assessed, subsequently, the plaque will be treated with HIFU therapy, and again the parameters will be assessed. Then, 4 weeks after treatment, all parameters will be assessed and the animal will be euthanized. The artery will be excised for histological assessment.

### **Specification of outcome parameters**

In experimental designs **1a** and **2a**, the main outcome parameters are:

- Acute effect on vessel diameter
- Acute effect on skin
- Acute effect on vessel (histology)
- Acute effect on surrounding tissue (histology)
- Accuracy of delivered ablations (histology)
- Size of delivered ablations (histology) (in relation with used energy and number of applications)

In experimental designs **1b** and **2b**, the main outcome parameters are:

- Long term effect on vessel diameter
- Long term effect on skin
- Long term effect on vessel structure (histology)
- Long term effect on adjacent tissues (histology)
- Accuracy of delivered ablations (histology)
- Size of delivered ablations (histology)

In experimental designs **1c** and **2c**, the main outcome parameters are:

- Ability to handle HIFU system
- Ability to target desired region (verification on imaging and histology)

In experimental design **3a**, the main outcome parameters are:

- Feasibility of the transplantation of plaques
- The blood level of inflammatory enzymes
- Physiological parameters relating to the arterial flow
- Signs of inflammation (histology)

In experimental design **3b**, the main outcome parameters are:

- The blood level of inflammatory enzymes
- Physiological parameters relating to the arterial flow between all measurements
- Feasibility of HIFU for the treatment of arterial plaques
- Blood flow/perfusion in 'downstream' tissues

### **Justification of outcome parameters**

The parameters described for **1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a** and **3b** can be measured objectively, and allow for unambiguous comparisons between the animals and different points in time.

The 'ability to handle the system' parameter described in 1c and 2c (training) is difficult to measure objectively. However the final readout parameter 'accuracy of targeting' can be measured on imaging and histology.

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

1. In experimental designs **1a** and **2a**, the animals will undergo relevant measurements (e.g. vessel diameter), subsequently ablation procedures will be performed. After the ablation procedure relevant measurement will be performed in order to the pre and post ablations measurements. After all procedures are completed, the animals will be euthanized and ablated tissues will be resected for histological analysis.
2. In experimental designs **1b** and **2b**, the animals will undergo the same procedures described in a, however the animals will survive after day 0. After either 2-4 days or 1-4 weeks of survival, the animals will undergo relevant measurement (e.g. vessel diameter). Subsequently the animals will be euthanized and ablated tissues will be resected for histological analysis.
3. In experimental designs **1c** and **2c**, animals will undergo relevant measurements (e.g. vessel

diameter), subsequently ablation procedures will be performed by clinical staff under guidance of a trainer. After the ablation procedure relevant measurement will be performed in order to the pre and post ablations measurements. During the procedure, the efficacy of the training will be measured by expert assessment. After all procedures are completed, the animals will be euthanized and ablated tissues will be resected for histological analysis to assess the ability of the trainee to correctly target the selected location.

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

To minimize the number or required animals, experiments will be combined if possible. For example in an experiment with follow-up (b), the acute measurement of the effect on vessel diameter after therapy with a specific energy level can be performed, which may obviate the need for a separate acute experiment. Furthermore, the acute experiments (a) can often be combined with the training sessions because during the training, the experienced trainer will first demonstrate the procedure on one side. The results from this ablation can be used as valid experimental results.

In each animal (experiments 1 and 3) the contralateral (untreated) femoral artery can serve as an intra-animal control for the physiological and histological measurements.

The results of each experiment (both type 1 and 2) will be used during the design of the next experiment to perform a more precise sample size calculation. Furthermore the increase in experience with the system and procedures during the full course of the experiments will lead to smaller variations and thus to fewer required animals.

## **B. The animals**

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

In all experiment we will use Dalland landrace pigs and are supplied by van Beek (Lelystad). In terms of size, anatomy and (patho)physiology, these animal are very comparable to human measures. Those properties ensure an optimal chance for translation from animal experiments to clinical practise. The animals will be several months old (60-75kg), when much older, the animals cannot be handled properly during experiments and may be too big for the used equipment. We cannot use smaller animals due to the size of the used equipment.

For all experiments described below, Dalland landrace pigs (60-75kg) will be used. We distinguish 2 different experiments, both with an acute, long-term and training design.

### **1. Ablation of the femoral artery**

#### **a. Acute experiment**

For these experiments we cannot yet perform a power calculation. From the experience with similar experiments, we know that 5 animals is usually sufficient to determine the effects of the therapy and possible acute complications. Wherever possible, the results of previous experiment will be used to perform a power calculation.

We expect to perform this type of experiment no more than four times in the next four years.

The maximum number of required animals = 5 animals x 4 times = 20 animals

#### **b. With follow-up**

For these experiments we cannot yet perform a power calculation. From the experience with similar experiments, we know that 5-10 animals is usually sufficient to determine the effects of the therapy and possible acute complications. Wherever possible, the results of previous experiment will be used to perform a power calculation.

We expect to perform this type of experiment no more than three times in the next four

years.

The maximum number of required animals = 10 animals x 3 experiments = 30 animals

**c. Training**

Prior to the introduction of the technique into clinical practise, the clinical staff will be trained on the procedure. We expect that 5 training sessions will be sufficient for one person. We plan to perform the first (single center) clinical safety and feasibility trial within 1.5 years after the start of this project. No more than 5 medical specialists will be directly involved in the first stages of the clinical studies.

We expect to train a maximum of 5 persons in the next four years.

The maximum number of required animals = 1 animal x 5 session x 5 persons = 25 animals

**2. Ablation of arteries or veins elsewhere**

**a. Acute experiment**

For these experiments we cannot yet perform a power calculation. From the experience with similar experiments, we know that 5 animals is usually sufficient to determine the effects of the therapy and possible acute complications. Wherever possible, the results of previous experiment will be used to perform a power calculation.

The vessels targeted in this experimental design are located in different regions (abdomen or neck). We expect to perform this type of experiment no more than 4 times in the next four years.

The maximum number of required animals = 5 animals x 4 times = 20 animals

**b. With follow-up**

For these experiments we cannot yet perform a power calculation. From the experience with similar experiments, we know that 5-10 animals is usually sufficient to determine the effects of the therapy and possible acute complications. Wherever possible, the results of previous experiment will be used to perform a power calculation.

We expect to perform this type of experiment no more than five times in the next four years.

The maximum number of required animals = 10 animals x 5 experiments = 50 animals

**c. Training**

Prior to the introduction of the technique into clinical practise, the clinical staff will be trained on the procedure. We expect that 5 training sessions will be sufficient for one person.

We expect to train a maximum of 3 persons in the next four years.

The maximum number of required animals = 1 animal x 5 session x 3 persons = 15 animals

**3. Ablation of transplanted arterial plaque**

**a. Feasibility**

For these experiments we cannot yet perform a power calculation. From the experience with similar experiments, we know that 10 animals is usually sufficient to determine the optimal strategy to create this experimental model. Wherever possible, the results of previous experiment will be used to perform a power calculation.

We expect to need no more than 3 experiments in the next 4 years to determine the feasibility.

The maximum number of required animals = 10 animals x 3 experiments = 30 animals

#### **b. Transplantation with therapy**

For these experiments we cannot yet perform a power calculation. From the experience with similar experiments, we know that 5-10 animals is usually sufficient to determine the effects of the therapy and possible acute complications. Experiment 3b, will be performed after experiment 3a is successful, the results of experiment 3a will be used to perform a power calculation.

We expect to perform this type of experiment no more than three times in the next four years.

The maximum number of required animals = 10 animals x 3 experiments = 30 animals

#### **Overall**

For all experiment described above we expect to require no more than 220 animals. However by combining experiment (also with other research groups) that do not interfere, the total number of used animals will most likely be greatly reduced (20-45%).

#### **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.

Every setting of therapy will be optimized in bench experiments (phantom/meat) prior to the *in vivo* experiments in order to enhance the therapeutical effect and minimize variation. However, since the outcome parameters are co-dependent on *in vivo* physiology, the research questions cannot be answered using bench experiments alone. Furthermore, the Medical Research Ethical Committee requires the evaluation in the preclinical setting (if possible) before allowing clinical trials.

Because many of the parameters are measured using histology, and thus require tissue excision, these experiments cannot be performed on human subjects.

Acute experiments (e.g. 1a, 1c, 2a and 2c) can be performed in animals of other studies (during the terminal experiment), provided that our experiment do not interfere with the outcome of the original study. This applies to experiments described in this type, type 2 of this project and experiments performed by other researchers. It should be noted that if acute experiments (described in this appendix) are performed on animals from another appendix/researcher, it will only be performed during the terminal experiment (i.e. the animal will not survive further).

By combining experiments (within and outside of this project) the total number of required animals will



be greatly reduced (20-45%).

Lastly, because our research group and the biotechnical support team is experienced with these types of experiments, the level of inter-experiment variation will be minimal.

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

All experiments will be performed under full anaesthesia. Perioperative analgesia will be applied to minimize pain.

During each experiment with follow-up, the total experimental duration will be kept as short as possible (without compromising the results). The animals will be closely monitored for signs of discomfort and will be treated medically if necessary.

### **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.

Prior to the experiments, the animals will be housed in groups. If the animals require oral medication after the procedure, they will be solitarily housed to ensure proper medication intake. Even in solitary housing, the animals will be in the same room and thus will be able to see, smell and hear the other animals.

#### **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.

Anaesthesia during all procedures. Peri-procedural analgesia will be administered.

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

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

Pain in leg/ limited mobility of leg. Pain relating to ablation of vessels in abdominal/neck.

Explain why these effects may emerge.

The ablation of the wall of vessels may lead to occlusion and subsequent ischemia. Occlusion has not been observed in previous procedures. Damage to tissue may lead to local pain.

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

A clear definition of the Humane Endpoints will prevent the occurrence of disproportionate effects leading to intolerable suffering of the animals. Extra analgesia will be administered if the animals show symptoms of pain.

### **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.

**All designs:** Not eating/drinking. Peripheral cyanosis, immobility >48h after intervention. Displaying symptoms of pain while receiving analgesia.

**Specifically for design 3:** an immune reaction may be characterized by selective damage to the liver, skin (rash), mucosa, and the gastrointestinal tract. Symptoms can be a rash, pneumonitis, congestion or fever.

**In all designs:** During the first 3 days after intervention, the researcher (or qualified substitute) will observe the animal for symptoms of discomfort.

Indicate the likely incidence.

Previous similar experiments have not shown complications such as vessel occlusion. We estimate that for experimental design the likelihood of complications leading to a humane endpoint is <10%. For experiment 3 the incidence of developing an immune reaction is expected to be <20%, since the animals are treated with immunosuppressive agents.

### **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').

Experimental design 1a, 1c, 2a, 2c, and 3a: 'non-recovery'

Experimental design 1b and 2b: moderate

Experimental design 3b: possibly severe in case of severe immune reaction (moderate is expected)

## **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.

Some of the primary outcome parameters can only be measured on histology, that requires excision of tissue.

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	HIFU for treatment of hypertension

*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.

Acute experiments (a) offer the possibility of directly measuring the accuracy of the delivered ablation by stimulation of the carotid body before and after ablation. Before ablation, blood pressure decreases after stimulation, while after correct ablation no immediate blood pressure change would be seen. These experiments also offer the possibility of directly measuring the effect (e.g. vessel diameter and histology (inflammation)) of the applied therapy, without the need for long term follow-up. In the experiments with follow-up (b) the short term effects (e.g. decrease in blood pressure, vessel diameter and inflammation) as well as the long term effects (e.g. accuracy of delivered ablations, changes in blood pressure, vessel diameter, lesion size, vessel wall histology) will be assessed. From previous experiments we know that longer term follow-up will allow for lesion maturation (1-4 weeks) and long term follow-up will allow for assessment of tissue response (e.g. formation of fistula and other complications). A 3-6 weeks follow up will allow for assessment of the accuracy and safety of the ablation (e.g. changes in blood pressure and respiratory pattern).

##### Ablation of the carotid body

###### a. Acute experiment

In this experiment continuous invasive blood pressure measurements are performed. The carotid body will be stimulated before and after ablation of the carotid body with the HIFU-DMUA-robotic arm system. On the same day, all relevant *in vivo* measurements (blood pressure and flow) will be done, subsequently the animals will be euthanized to assess histology.

###### b. With follow-up

In the experiment on day 0 the carotid body will be stimulated before and after ablation of the carotid body with the HIFU-DMUA-robotic arm system, while measuring blood pressure.

Ambulatory blood pressure measurements will be performed during follow-up. Then, after 3-6 weeks of survival, all relevant *in vivo* measurements will be done, subsequently the animals will be euthanized to assess histology.

**Primary outcome parameters:**

- a.**
- Accuracy of delivered ablations (blood pressure measurements during/after stimulation of the carotid body)
  - Survival of the animal
  - Acute effect on vessel diameter
  - Acute effect on skin
  - Acute effect on surrounding nerves
  - Acute effect on vessel (histology)
  - Acute effect on surrounding tissue (histology)
  - Accuracy of delivered ablations (histology)
- b.**
- Accuracy of delivered ablations (blood pressure measurements during/after stimulation of the carotid body)
  - Survival of the animal
  - Long term effect on blood pressure
  - Long term effect on vessel diameter
  - Long term effect on skin
  - Long term effect on surrounding nerves
  - Long term effect on vessel (histology)
  - Long term effect on surrounding tissue (histology)
  - Accuracy of delivered ablations (histology)

**Justification of outcome parameters**

The parameters described can be measured objectively, and allow for unambiguous comparisons between the animals and different points in time.

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

1. In experimental design **1a** blood pressure of the animals will be monitored continuously. Stimulation of the carotid body will be performed and subsequently bilateral ablation of the carotid body will be performed. After the ablation procedure relevant measurements will be performed (e.g. blood pressure measurements before/after stimulation of the carotid body, to measure the effectiveness of the ablation). After all procedures are completed, the animals will be euthanized and ablated tissues will be resected for histological analysis.
2. In experimental design **1b** the animals will undergo the same procedures described in **a**, however the animals will survive after day 0. After 3-6 weeks of survival, the animals will undergo relevant measurements to evaluate accuracy and safety of the ablations (e.g. complications to the surrounding tissue, effectiveness of the ablation by measuring the effect of carotid body stimulation etc.). Subsequently the animals will be euthanized and ablated tissues will be resected for histological analysis.

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

To minimize the number or required animals, experiments will be combined if possible (e.g. with experiments of type 1 of this project). If the results of the study types do not interfere, the reduction could be 20-45%.

Also the results of the safety measurements of type 1 of this project can be used to write more specific protocols for the experiments of type 2. This leads to smaller variations and thus to fewer required animals.

The results of each experiment (both type 1 and 2) will be used during the design of the next experiment to perform a more accurate sample size calculation.

#### **B. The animals**

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

In all experiment we will use Daland landrace pigs and are supplied by van Beek (Lelystad). In terms of size, anatomy and (patho)physiology, these animal are very comparable to human measures. Those properties ensure an optimal chance for translation from animal experiments to clinical practise. The animals will be several months old (60-75kg), when much older, the animals cannot be handled properly during experiments and may be too big for the used equipment. We cannot use smaller animals due to the size of the used equipment. Furthermore, in this animal species, the carotid body is located in the bifurcation of the carotid artery, the same position as in humans. In previous experiments, we were able to stimulate the carotid body and thereby influence blood pressure.

For the acute experiments (a) we cannot perform a power calculation. From the experience with similar experiments, we know that 5 animals is usually sufficient to determine the effects of the therapy and possible acute complications.

We expect to perform this type of experiment no more than four times in the next four years.

The maximum number of required animals = 5 animals x 4 years = 20 animals

For the long term experiments (b) we cannot yet perform a power calculation. From the experience with similar experiments, we know that 5-10 animals is usually sufficient to determine the effects of the therapy and possible acute complications. Wherever possible, the results of the previous experiments will be used to perform a more accurate power calculation.

We expect to perform this type of experiment no more than four times in the next four years.

The maximum number of required animals = 10 animals x 4 experiments = 40 animals

For the experiments described above we expect to require no more than 60 animals. However by combining experiment (also with other research groups) that do not interfere, the total number of used animals will most likely be greatly reduced (20-45%).

#### **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.

Every setting of therapy will be optimized in bench experiments (meat) prior to the animal experiments in order to enhance the therapeutic effect and minimize variation. However, since the outcome parameters are co-dependent on *in vivo* physiology, the research questions cannot be answered using bench experiments alone. Furthermore, the Medical Research Ethical Committee requires the evaluation

in the preclinical setting (if possible) before allowing clinical trials.

Acute experiments can be performed in animals of other studies (during the terminal experiment), provided that our experiments do not interfere with the outcome of the original study. This applies to experiments described in this type, type 1 of this project and experiments performed by other researchers. It should be noted that if acute experiments (described in this appendix) are performed on animals from another appendix/researcher, it will only be performed during the terminal experiment (i.e. the animal will not survive further).

By combining experiments (within and outside of this project) the total number of required animals will be greatly reduced (20-45%).

Because many of the parameters are measured using histology, and thus require tissue excision, these experiments cannot be performed on human subjects.

Lastly, because our research group and the biotechnical support team is experienced with these types of experiments, the level of inter-experiment variation will be minimal.

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

All experiment will be performed under full anaesthesia. Periprocedural analgesia will be applied to minimize pain.

During each experiment with follow-up, the total experimental duration will be kept as short as possible (without compromising the results). The animals will be closely monitored for signs of discomfort and will be treated medically if necessary.

## 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.

Prior to the experiments, the animals will be housed in groups. If the animals require oral medication after the procedure, they will be solitarily housed to ensure proper medication intake. Even in solitary housing, the animals will be in the same room and thus will be able to see, smell and hear the other animals.

### 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.

Anaesthesia during all procedures. Peri-procedural analgesia will be given.

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

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

Pain around the target area. Complications related to nerve damage. Changed respiratory pattern.

Explain why these effects may emerge.

The ablation of the wall of vessels may lead to occlusion and subsequent ischemia. Occlusion has not been observed in previous procedures. Damage to tissue may lead to local pain and/or nerve (n. (glosso)pharyngeal, n. vagus, n. sympathetic) damage.

The carotid body influences blood pressure as well as respiratory function, since they are sensitive to small alterations in blood O<sub>2</sub>, pH, CO<sub>2</sub> and blood flow.

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

Results of the safety measurements (e.g. damage to surrounding tissue) of type 1 of this project will be used to provide a detailed protocol for these experiments. A clear definition of the Humane Endpoints will prevent the occurrence of disproportionate effects leading to intolerable suffering of the animals. Extra analgesia will be administered if the animals show symptoms of pain. Damage to the surrounding nerves will be monitored.

### 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.

No food/fluid intake. Immobility for more than 48 hours postoperative. Recognisable pain while receiving analgesia.

During the first 3 days after intervention, the researcher (or substitute) will observe the animal for symptoms of discomfort.

Indicate the likely incidence.

Previous similar experiment have not shown complications such as vessel occlusion. We estimate that for experimental design the likelihood of complications leading to a humane endpoint is <10%.

### 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').

1a: non-recovery.

1b: severe (in case of complications, moderate if no complication occur)



## 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.

After the procedure histology should be performed to analyse the effect of the ablation on the target tissue and the surrounding tissue.

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

#### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2017.II.532.032
2. Titel van het project : High Intensity Focussed Ultrasound for non-invasive ablation therapy
3. Titel van de NTS : Een niet invasieve ablatie therapie door middel van ultrageluid

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht  
 Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247  
 Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 14-08-2017  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 23-08-2017  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 08-09-2017/08-09-2017 en 19-09-2017/19-09-2017  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 26-09-2017

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

#### 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 08-09-2017
- Datum antwoord: 08-09-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

## Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De hypothese van de werking van Ultrasound op de atherosclerotische plaque mist (achtergrond, onderbouwing van hoe het functioneert, wat gebeurt er met het vat). Graag nog toevoegen aan de aanvraag.  
*Toegevoegd in 3.1 onder het kopje atherosclerose: Onder het kopje previous studies staan de effecten op het vat beschreven (geen endotheel schade etc).*
- 3.1 Achtergrond: Wat is er aan in vitro werk gedaan? Graag opnemen in de aanvraag.  
*Er zijn een aantal in vitro experimenten gedaan, veelal op biefstukken. Daarnaast zullen er voor een aantal dierexperimenten eerst nog in vitro studies plaatsvinden. We hebben info hierover toegevoegd.*
- 3.1 Achtergrond: Wat is het effect van bestraling op de harde plaque? Heeft dit een risico van embolie of destructie? Graag nader toelichten.  
*Het exacte effect van HIFU op harde plaques in vivo is vooralsnog niet geheel duidelijk omdat dit op deze manier nog niet is getest. Alvorens een dierstudie te verrichten naar het dit effect, zullen wij in een flow opstelling hiernaar onderzoek doen. De verwachting is dat de plaque veel van de HIFU energie zal absorberen en daarna vaporiseert of uiteen zal vallen. Bij therapieën met een vergelijkbaar werkingsmechanisme levert dit geen embolische effecten op. De info hierover is toegevoegd op de relevante plaatsen. Daarnaast zijn de extra benodigde stappen voor de plaque transplantaties (incl. bench experimenten) opgenomen in de figuur bij de milestones. Ook zijn geplande in vitro proeven opgenomen in figuur 4.*
- 3.1 Achtergrond: Hoe is de transleerbaarheid van het diermodel naar de mens in het kader van de anatomie, de zenuwen en de carotid body?  
*De carotid body is aanwezig bij zoogdieren en bevat, net als bij mensen, zowel chemoreceptoren als baroreceptoren. Bij varkens ligt de carotid body, net als bij de mens, in de bifurcatie van de carotis communis. In eerste experimenten waren wij in staat om de carotid body via een catheter te stimuleren en daarmee de bloeddruk te beïnvloeden. • We hebben deze punten toegevoegd aan zowel de inleiding als in bijlage type 2 (paragraaf B).*
- 3.1 Achtergrond: Heeft u voor het verkrijgen van het humane materiaal toestemming?  
*Nee, maar omdat het hier restmateriaal betreft voorzien wij geen problemen met het verkrijgen van toestemming. Ook is het mogelijk dergelijk materiaal te verkrijgen uit lichamen die ter beschikking zijn gesteld aan de wetenschap. Het verkrijgen van dit materiaal is als GO/NO GO opgenomen in figuur 3 in het hoofdformulier.*
- 3.2 Doel: U berekent aantallen dieren op basis van 5 jaar, maar na 1,5 jaar gaat u al naar de kliniek. Deze discrepantie dient uit de aanvraag gehaald te worden of nader onderbouwd.  
*We hebben de totale duur van dit project aangepast naar 4 jaar. De verwachting is dat op deze termijn de efficiëntiestudie naar de behandeling van atherosclerose zal zijn voltooid dan wel ruim onderweg is. Als die is voltooid zullen vragen die dan nog resten, en met dierproeven moeten worden beantwoord, worden opgenomen in een nieuwe CCD aanvraag. We verwachten na 1.5 jaar naar de kliniek te kunnen voor een veiligheidsstudie*

*voor het behandelen van arterosclerose. Naar aanleiding van die studie, maar ook door nieuwe inzichten is het mogelijk dat er extra proeven nodig zijn. Daarnaast zullen er tijdens de dierstudies nieuwe inzichten of vragen ontstaan die middels vervolgprouven moeten worden beantwoord. Het onderzoek naar de behandeling van hypertensie zal dan nog in een onderzoeksfase verkeren. De planning is duidelijk gemaakt middels figuur 4 in het hoofddocument.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Ten behoeve van de feasibility van het transplantatiemodel dienen de go/no go's duidelijk te worden aangegeven (ook vermelden in bijlage 1). *Ter verduidelijking hebben we bovenstaande flowchart toegevoegd.*

#### Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is de DEC niet helder waarom de andere venen worden bestraald? Graag toelichten.  
*Plaques kunnen ook in andere vaten voorkomen dan in de beenvaten. Omdat de omliggende structuren anders zijn bij andere vaten moeten ook ablaties elders worden onderzocht om het effect op verschillende omliggende weefsels te onderzoeken. In bijlage 1 is geen goede plaats om deze redenatie te plaatsen, ter verduidelijking hebben we extra uitleg toegevoegd in het hoofddocument onder research strategy.*

#### Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC adviseert u te vermelden dat de ingreep unilateraal wordt uitgevoerd.  
*Uit eerdere studies is gebleken dat voor een effectieve behandeling de carotid body denervatie bilateraal moet worden uitgevoerd. In de huidige studie kijken we eerst of het haalbaar is om met onze techniek de carotid body uit te schakelen. In een vervolgstudie zullen we dan ook onderzoeken of deze denervatie ook op de langere termijn stand houdt. Omdat in een eventuele vervolgstudie (efficiëntie in een hypertens model) de behandeling bilateraal moet worden uitgevoerd zijn wij voornemens dat hier ook te doen. Deze studie onderzoekt namelijk de haalbaarheid van de procedure, het overleven het dier valt hier ook onder. Een dergelijke uitleg is toegevoegd aan zowel het hoofddocument als bijlage 2. De uitkomst 'survival' is ook toegevoegd als primaire uitkomst parameter bij beide studies beschreven in type 2.*
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af wat de ratio is van het bestralen van de carotid body. Het betreft immers niet dieren met een hypertensie. Graag toelichten.  
*Zie ook vorige vraag. In deze studie gebruiken we inderdaad geen dieren met hypertensie. We kunnen daarom niet onderzoeken of bestaande hypertensie zal afnemen. Wel kan worden onderzocht of de nieuwe techniek kan worden gebruikt om de carotid body (op langere termijn) te denerveren, zonder ernstige complicaties. In een verdere studie zal het therapeutisch effect moeten worden onderzocht in dieren met hypertensie.*

*De opmerking dat dit deel van de studie niet gericht is op efficiëntie is tevens toegevoegd aan het hoofddocument paragraaf 3.4.*

- K. Classificatie van ongerief: U geeft met betrekking tot het ongerief aan: "1b: severe (in case of complications, mild if no complication occur)", maar bij geen complicaties is het ongerief matig, niet licht.

*Aangepast in bijlage 2.*

#### Niet Technische Samenvatting

- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: Het ongerief komt niet overeen met het ongerief in de bijlagen.

*Aangepast in NTS.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum vragen: 19-09-2017

- Datum antwoord: 19-09-2017

- Gestelde vragen en antwoorden:

#### Projectvoorstel

- In vooronderzoek hebt u een carotid body geableerd. De DEC adviseert om de feitelijke invloed op de bloeddruk en hartfrequentie te vermelden omdat de bevindingen essentieel zijn voor het starten van dit onderzoek.

*Tijdens een voorgaand onderzoek hebben we de carotid body gestimuleerd, niet geableerd. In de 'project proposal' hebben we in '3.1 Background' de volgende tekst bijgevoegd ter verduidelijking: "During a previous experiment, we could clearly visualize and identify the carotid bifurcation with our conventional echo machine. Thereafter, we positioned a quadripolar linear catheter in situ and started stimulating while monitoring blood pressure. In resting state, the blood pressure was approximately 160/110mmHg. We were able to decrease the blood pressure to 110/70mmHg during stimulation of the carotid body. Upon stopping stimulation, a blood pressure increase to (160/110mmHg was observed. We successfully repeated this procedure and saw the same pattern (decrease while stimulating, increase to baseline thereafter). With this experiment we have demonstrated a method to assess carotid body ablation (if the carotid body is ablated, no drop in blood pressure will occur upon stimulation)."*

- De DEC adviseert het statement 'atherosclerose komt voor in arteriën en venen' te nuanceren bijv. 'de lesies zitten voornamelijk in arteriën en nauwelijks of minder in venen'. Het is de DEC overigens duidelijk dat ivm de safety studie omliggende venen onderdeel zijn van het onderzoek.

*Eerste zin van bijlage 1 is gewijzigd naar: "Atherosclerotic plaques predominantly arise in arteries, but may also be found in veins."*

- De DEC acht het een verstandige beslissing de duur van het onderzoek te beperken tot 4 jaren. Desalniettemin blijft er een discrepantie tussen de totale duur en het noemen van de 1½ jaar nodig om de eerste studie naar de kliniek te brengen voor een safety studie. De DEC adviseert om duidelijker aan te geven welk type onderzoek mogelijk in tweede fase in de dieren gedaan moet worden bijvoorbeeld door het geven van een voorbeeld.

*Onder het kopje research strategie (3.4) hebben we de volgende tekst toegevoegd om duidelijk te maken dat het na 1.5 niet per definitie klaar is: "The planned clinical introduction of HIFU therapy for PAD, ~1.5 years after the start of this project, might raise several issues or questions or give new insights. To accommodate these issues and questions, it is possible that more preclinical studies need to be performed. Examples of such issues may for example be undertreatment of the plaque (due to a too low dose), in such a case higher dose therapies need to be evaluated for safety in a preclinical model. Furthermore, a novel design of the HIFU probe (to for example target deeper vessels) may require a preclinical evaluation of safety, feasibility and efficacy. Additionally, during the years following the clinical introduction of this therapy, clinical staff need to be trained."*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### 10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

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

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.

### **C. Beoordeling (inhoud):**

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het beschrijft het onderzoek naar de toepassing van High Intensity Focussed Ultrasound (HIFU) voor niet invasieve ablatie therapie bij atherosclerose patiënten en patienten met hoge bloeddruk. De ziekte perifere atherosclerose is een belangrijk gezondheidsprobleem. Momenteel is de therapie voornamelijk gericht op het voorkómen van secundaire risico's, oefentherapie en eventueel chirurgische interventie. De resultaten van chirurgische interventies zijn echter na 5 jaar teleurstellend. Met de nieuwe techniek wordt door middel van gefocuseerde ultrasound met hoge intensiteit weefsel behandeld. Daarvoor is een nieuw device ontwikkeld dat niet alleen het weefsel zichtbaar maakt zoals de huidige echografie, maar tevens kan een beschadiging worden aangebracht (plaques weggehaald). Bij patiënten met hoge bloeddruk welke niet goed reageren op medicatie zou een beschadiging van het regelcentrum met HIFU van de bloeddruk een herstel opleveren. Er is grote behoefte aan deze alternatieve behandelwijze: er is een grotere slagingskans waardoor amputaties bij perifeer lijden zouden kunnen voorkomen en bij patiënten met hoge bloeddruk

de kans op een infarct verminderen. Met de HIFU kan via minimale invasieve techniek de behandeling plaatsvinden. Dit is voor de patiënt veel prettiger, heeft een hogere succes kans en bespaard de gezondheidszorg veel geld. De werking van het systeem is al op fantoommodellen en kadavers uitgetoet, en moet nu in-vivo de effectiviteit aantonen en indien die er zijn, de risico's op omgevende weefsels in kaart brengen. Het varken is daarvoor het aangewezen model omdat het formaat van de bloedvaten en de bloeddruk sterk op die van de mens lijkt. Tijdens de ablatie wordt gelet op (ongewenste) klinische bijverschijnselen, en er wordt na afloop op verschillende tijdstippen met behulp van histologisch onderzoek naar effect van de ablatie en eventuele schade op omgevingsweefsel gecontroleerd. Dit onderzoek vindt plaats voor beide beschreven toepassingen: atherosclerose en hypertensie. Zodra de toepassing effectief en veilig is gebleken willen de onderzoekers dit gaan toepassen in patiënten. Ook worden artsen getraind om deze toepassing in patiënten veilig te kunnen uitvoeren.

De voorgestelde experimenten zijn naar de mening van de commissie DEC logisch en helder opgeschreven en beargumenteerd, en ze zijn nodig om het beoogde concrete resultaat te bereiken. Alle stappen in het project zijn voldoende uitgewerkt, met duidelijke uitkomstparameters en beslismomenten en bevatten geen onzekerheden. Gezien bovenstaande is de DEC van oordeel dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 4B uit de "Handreiking Invulling Definitie Project".

2. Er is mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan. Dat betreft het gebruik van humaan materiaal. Echter de aanvrager heeft duidelijk aangegeven dat gebruik van humaan materiaal alleen gebeurt met toestemming van (overleden) patiënten of de METC. Hetzelfde geldt voor toepassing later in patiënten: ook al valt dit buiten de scope van de DEC, er is aangegeven dat dit alleen met toestemming van de METC zal gebeuren.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is om te onderzoeken of deze nieuwe techniek van High Intensity Focussed Ultrasound technisch bruikbaar is (aanbrengen van beschadigingen in vaatwand (voor atherosclerose) en of carotid body (herstel normale bloeddruk) zonder onaanvaardbare schade aan het omliggende weefsel. Het uiteindelijke doel van het project is aantonen dat deze techniek bruikbaar is en de ingreep voor de patiënten meerwaarde hebben ten opzichte van de huidige behandelmethode. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, het onderzoeksveld en de patiënten welke chirurgisch behandeld moeten worden voor

atherosclerose of hoge bloeddruk. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (stress) en de rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de patiënt worden bevorderd zijn: herstel van perifere circulatie/hoge bloeddruk zonder kans op bijkomende complicaties. De morele waarden die voor het onderzoeksveld worden bevorderd zijn: wetenschappelijke ontwikkelingen doordat meer inzicht wordt verkregen in het gebruik van hoogwaardige nieuwe technieken, in dit geval High Intensity Focussed Ultrasound.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente inzichten en dat het geen belangrijke hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten beperken. De groep geniet grote bekendheid op dit gebied en heeft ervaring met het voorgestelde model. Daarom moet het haalbaar zijn dat de resultaten van dit project op termijn leiden het gebruik van HIFU bij patienten.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Recent onderzoek in vitro kadaver materiaal heeft laten zien dat de techniek veilig moet kunnen worden toegepast. Dat is de aanleiding voor het huidige beschreven verdere onderzoek in levende diermodellen.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)



10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De dieren worden onder anesthesie gebracht waarna een of meerdere ablaties worden uitgevoerd. Tijdens de ingreep wordt goed gecontroleerd of er lokaal en of systemisch klinische symptomen zijn waardoor de toepassing niet veilig zou kunnen worden toegepast. Aan het einde van het experiment wordt post-mortem de staat van de ablatie en het omliggende weefsel histologisch verder onderzocht. Het is logisch dat verder histopathologisch onderzoek alleen kan worden uitgevoerd indien het dier wordt gedood.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek en mogelijk gedragsmatig aangetast (minder eetlust). Door de operatie hebben de dieren tijdelijk last van pijn.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Het betreft een in principe lichte ingreep onder volledige anesthesie. Een complicatie bij ablatie van vaten kan zijn dat er een occlusie optreedt met ischemie tot gevolg. Indien dit proportioneel is, wordt een humaan eindpunt toegepast. De proeven worden uitgevoerd door zeer ervaren mensen en er is een dierenarts in huis voor overleg en of behandeling bij complicaties.

### 3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Om de *in vivo* functionaliteit voor toepassing in de mens te kunnen onderzoeken is het noodzakelijk om schade bij atherosclerotische plaques of carotid body aan te brengen om zo genezing en een herstel van de ziekte te bevorderen zonder dat er bijwerkingen optreden in een anatomisch vergelijkbaar dier. Daarbij is het noodzakelijk om vast te stellen of deze methode veilig kan worden toegepast in de mens.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Er is al veel vooronderzoek uitgevoerd met *ex vivo* methoden. Het betreft hier een beschrijvende studie waarvoor wel bruikbare data moeten worden verzameld die zullen voldoen aan gestelde richtlijnen voor toepassing in de mens.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De operaties worden door zeer deskundige cardiovasculair chirurgen uitgevoerd en begeleidt door een dierenarts. De perioperatieve zorg is gelijk aan de zorg welke aan humane patiënten wordt gegeven.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Dieren van beide geslachten (afhankelijk van de beschikbaarheid) zullen worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Histopathologisch onderzoek van het gebied dat behandeld is, is een belangrijk onderdeel om de buikbaarheid en veiligheid vast te stellen. Explantatie van het behandelde gebied voor atherosclerose is theoretisch mogelijk, maar dan is herstel van de bloedsomloop opnieuw nodig. Dat brengt dan ernstig ongerief met zich mee. Het is dus logisch dat het dier wordt gedood om de weefsels uit te kunnen nemen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

*NTS*

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

#### **D. Ethische afweging**

1. De centrale morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is: rechtvaardigt het belang van voorliggend project, namelijk effectiviteit en veiligheid aantonen van High Intensity Focussed Ultrasound voor toepassing op patiënten met onbehandelbaar perifeer lijden of hoge bloeddruk, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren?
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief.  
Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat patiënten met aandoeningen welke een chirurgisch ingrijpen nodig hebben om de bloedsomloop of bloeddruk te herstellen beter geholpen kunnen worden. De chirurg kan met de nieuwe techniek het gebied goed beoordelen en tegelijkertijd de ablatie toepassen. Voor de patiënt is deze nieuwe methode veel minder invasief en de succeskans lijkt veel beter. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat de evaluatie van High Intensity Focussed Ultrasound toepassing voor patiënten met vaatlijden of onbehandelbare hoge bloeddruk een essentieel belang vertegenwoordigt omdat de huidige behandelmethoden veel

nadelen hebben en dat dit essentiële belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

#### **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 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 is gebaseerd op consensus.

##### 3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD1150020173566

**Bijlagen**

2

Datum 4 oktober 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 oktober 2017. Het gaat om uw project "High Intensity Focussed Ultrasound for non-invasive ablation therapy". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020173566. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

### **Wacht met de uitvoering van uw project**

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

### **Factuur**

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

**Meer informatie**

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

**Datum:**  
4 oktober 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020173566

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
4 oktober 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020173566

#### **Gegevens aanvrager**

##### **Uw gegevens**

**Deelnemersnummer NVWA:** 11500  
**Naam instelling of organisatie:** UMC Utrecht  
**Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:** [REDACTED]  
**KvK-nummer:** 30244197  
**Postbus:** 12007  
**Postcode en plaats:** 3501 AA UTRECHT  
**IBAN:** NL27INGB0000425267  
**Tenaamstelling van het rekeningnummer:** Universiteit Utrecht

##### **Gegevens verantwoordelijke onderzoeker**

**Naam:** [REDACTED]  
**Functie:** Postdoc  
**Afdeling:** Cardologie  
**Telefoonnummer:** [REDACTED]  
**E-mailadres:** [REDACTED]

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Datum:

4 oktober 2017

Aanvraagnummer:

150020173566

**Over uw project**

Geplande startdatum:

1 december 2017

Geplande einddatum:

1 december 2021

Titel project:

High Intensity Focussed Ultrasound for non-invasive ablation therapy

Titel niet-technische samenvatting:

Een niet invasieve ablatie therapie door middel van ultrageluid

Naam DEC:

DEC Utrecht

Postadres DEC:

Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.287,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

 DEC-advies**Ondertekening**

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Utrecht

Datum:

2 oktober 2017



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC

Postbus 80.011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centraalcommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD1150020173566

**Bijlagen**

2

Datum 4 oktober 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

### Factuur

Factuurdatum: 4 oktober 2017

Vervaldatum: 3 november 2017

Factuurnummer: 173566

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020173566	€ 1.287,00

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



**From:** [Info-zbo](mailto:Info-zbo)  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#); [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#)  
**Subject:** vraag bij de behandeling van AVD1150020173566  
**Date:** 24 October 2017 13:45:51

---

Geachte [REDACTED]

Bij de behandeling van uw aanvraag AVD1150020173566 getiteld: 'High Intensity Focussed Ultrasound for non-invasive ablation therapy' hebben wij nog een vraag. U beschrijft dat er sprake is van hergebruik en dat deze dieren in een voorgaande dierproef mogelijk ernstig ongerief hebben ondergaan. Wanneer dit het geval is, is hergebruik verboden. Kunt u beschrijven wat u hiermee beoogt?

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Namens **Centrale Commissie Dierproeven**  
**[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)**

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

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

Reactie op vragen gesteld door CCD, mbt AVD1150020173566, per mail dd 24-10-2017

**Bij de behandeling van uw aanvraag AVD1150020173566 getiteld: 'High Intensity Focussed Ultrasound for non-invasive ablation therapy' hebben wij nog een vraag.**

**U beschrijft dat er sprake is van hergebruik en dat deze dieren in een voorgaande dierproef mogelijk ernstig ongerief hebben ondergaan. Wanneer dit het geval is, is hergebruik verboden.**

**Kunt u beschrijven wat u hiermee beoogt?**

Geachte CCD,

Waar mogelijk zullen de acute experimenten worden uitgevoerd tijdens de terminatie in dieren van experimenten met een follow-up die onderdeel uitmaken van dit project of in experimenten van andere onderzoekers. Feltelijk is er hierbij geen sprake van hergebruik, maar worden deze acute experimenten dan uitgevoerd als additionele handelingen in de terminale fase. Dit vindt ook plaats indien het experiment reeds als ernstig is geclassificeerd, de dieren zullen namelijk geen additioneel ongerief ervaren aangezien zij tijdens de procedure onder volledige anesthesie (en analgesie) zijn en daarna ook worden getermineerd (tijdens dezelfde anesthesie). Uitgangspunt is dat de additionele handelingen niet interfereren met de resultaten van het originele experiment en vice versa. Er zullen geen additionele experimenten worden uitgevoerd op dieren (uit deze studie, of studies van andere onderzoekers) die de procedure overleven (experiment met follow -up). In de tekst van zowel bijlage 1 als bijlage 2 hebben wij tekst aangepast (in het rood) waarmee we dit duidelijk maken. Gezien het bovenstaande is de tekst op enkele onderdelen van de bijlagen aangepast (in rood). Tevens is bij onderdeel C van de bijlagen aangegeven dat er geen hergebruik plaatsvindt.

Wij hopen dat we uw vraag hiermee hebben beantwoord en de bezwaren hebben weggenomen.

Met vriendelijke groet,

██████████



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1150020173566  
**Bijlagen**  
1

Datum 16 november 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 2 oktober 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "High Intensity Focussed Ultrasound for non-invasive ablation therapy" met aanvraagnummer AVD1150020173566. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 17 november 2017 tot en met 1 november 2021.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

*Aanvullende opmerkingen*

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

## **Procedure**

**Datum:**  
16 november 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020173566

### *Advies dierexperimentencommissie*

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is ontvangen op 2 oktober 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullend advies gevraagd over hergebruik van dieren in relatie tot de ongeriefclassificatie. Op 26 oktober 2017 hebben wij het aanvullend advies van de DEC ontvangen. Het advies van de DEC en het aanvullend advies is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 24 oktober 2017 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op het hergebruik van dieren waarvan het ongerief in voorgaande dierproeven als ernstig is geclassificeerd. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

## **Overwegingen**

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Het hergebruik van dieren die in de voorgaande dierproef ernstig ongerief hebben ondergaan is niet toegestaan. Tenzij de procedure wordt uitgevoerd tijdens de terminale anesthesie van de voorgaande dierproef. In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven en zijn hieronder toegelicht. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk november 2022 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

## **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.

**Datum:**  
16 november 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020173566

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



# Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 november 2017 tot en met 1 november 2021, voor het project "High Intensity Focussed Ultrasound for non-invasive ablation therapy" met aanvraagnummer AVD1150020173566, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Postdoc.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 2 oktober 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 2 oktober 2017;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.4.1 HIFU for (peripheral) vascular disease, zoals ontvangen op 9 november 2017;
    - 3.4.4.2 HIFU for treatment of hypertension, zoals ontvangen op 9 november 2017;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 2 oktober 2017;
  - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 2 oktober 2017;  
Aanvullend advies, zoals ontvangen op 26 oktober 2017
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 9 november 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
<b>3.4.4.1 HIFU for (peripheral) vascular disease</b>			
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	220	50,0% Terminaal 50,0% Matig
<b>3.4.4.2 HIFU for treatment of hypertension</b>			
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	60	33,0% Terminaal 67,0% Ernstig

## Voorwaarden

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk november 2022 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020173566

wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

*Ter informatie*

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



**Aanvraagnummer:**

AVD1150020173566

## 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 onvereenigbaar 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:**

AVD1150020173566

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.

**Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.



# Formulier

## Beoordeling achteraf

(Versie 11 juli 2018)

- Dit formulier gebruikt u om uw beoordeling achteraf te schrijven.
- Gebruik bij het invullen van dit formulier de Toelichting op het formulier 'Beoordeling achteraf'.
- Meer informatie over de beoordeling achteraf vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul het AVD nummer in.	AVD1150020173566						
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder in.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>E-mailadres contactpersoon</td><td>info@ivd-utrecht.nl</td></tr><tr><td>(Optioneel) e-mailadres Instantie voor Dierenwelzijn</td><td></td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl	(Optioneel) e-mailadres Instantie voor Dierenwelzijn	
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht							
E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl							
(Optioneel) e-mailadres Instantie voor Dierenwelzijn								
1.3	Vul hier de gegevens van de verantwoordelijk onderzoeker in.	<table><tr><td>Titel, voorletters en achternaam</td><td>██████████</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>██████████</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>████████████████████████████████████████</td></tr></table>	Titel, voorletters en achternaam	██████████	Telefoonnummer	██████████	E-mailadres	████████████████████████████████████████
Titel, voorletters en achternaam	██████████							
Telefoonnummer	██████████							
E-mailadres	████████████████████████████████████████							

1.1	Vul de titel van het project in.	High Intensity Focussed Ultrasound for non-invasive ablation therapy
-----	----------------------------------	----------------------------------------------------------------------

### 2 Gebruik dieren

2.1	Geef per bijlage en per diersoort aan hoeveel dieren u heeft gebruikt. -Indien niet alle aangevraagde diersoorten gebruikt zijn, licht dit toe. -Indien dit afwijkt van het aantal dieren in de vergunning, verklaar het verschil.	<p>Bijlage 1: 19 varkens (220 in vergunning) Bijlage 2: 4 varkens (60 in vergunning)</p> <p>Er zijn veel minder dieren gebruikt dan aangevraagd, dit heeft verschillende oorzaken. Allereerst zijn er experimenten gecombineerd waar mogelijk, door bijvoorbeeld bij een proef met follow up, een acuut experiment uit te voeren op de dag van de terminatie. Daarnaast zijn er ook proeven verricht in samenwerking met andere onderzoeken uit andere projecten, zoals bijvoorbeeld onderzoek passend bij AVD115002015206.</p>
-----	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ook is een deel van de aangevraagde experimenten niet uitgevoerd omdat er met het aantal uitgevoerde experimenten genoeg goede resultaten waren om verder te gaan met een klinische studie. Omdat de klinische studie vertraging heeft opgelopen (o.a. door covid), is vervolgonderzoek (in het diermodel) naar bijvoorbeeld andere anatomische targets uitgesteld.

Daarnaast hebben we bij de proeven zoals beschreven in bijlage 2 gezien dat het varken niet het optimale diermodel is om de gewenste experimenten uit te voeren, omdat de carotid body bij de varkens niet altijd binnen de optimale therapeutische range ligt. Hierdoor zou er een te grote variatie in studieresultaten ontstaan. Hoewel onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft met experimenten met varkens (voornamelijk aan het hart), was deze ervaring er nog niet op het gebied van de carotis en carotid body.

- 2.2 Geef per bijlage en per diersoort aan: het aantal dieren dat terminaal, licht, matig of ernstig ongerief heeft ondergaan.  
-Indien dit afwijkt van het vooraf ingeschatte cumulatieve ongerief, verklaar het verschil.

Bijlage 1: 7 terminaal (zoals verwacht), 12 matig (zoals verwacht)  
Bijlage 2: 4 terminaal (zoals verwacht)

### 3 De 3V's

- 3.1 Vervanging  
Zijn er tijdens het project voor het project relevante mogelijkheden voor vervanging naar voren gekomen?  
- Zo ja, welke?  
- Zo ja, in hoeverre heeft u deze kunnen toepassen in het project?  
-Zo ja, in hoeverre zijn deze mogelijkheden relevant voor toekomstig onderzoek?

Nee, niet meer dan voorzien.

- 3.2 Vermindering  
Zijn er tijdens het project voor het project relevante mogelijkheden voor verdere vermindering naar voren gekomen?  
- Zo ja, welke?  
- Zo ja, in hoeverre heeft u deze kunnen toepassen in het project?  
- Zo ja, in hoeverre zijn deze mogelijkheden relevant voor toekomstig onderzoek?

Ja, er zijn acute experimenten uitgevoerd tijdens de terminatie van een experiment met follow up. Dit hadden we van tevoren ook in de projectaanvraag aangegeven, en bleek mogelijk in een aantal gevallen. Deze manier van vermindering is in de toekomst zeker relevant en zullen we altijd overwegen.

- Was het vooraf ingeschatte aantal dieren per proefgroep optimaal voor betrouwbare statistische analyse?

### 3.3 Verfijning

- Zijn er tijdens het project voor het project relevante mogelijkheden voor verdere verfijning naar voren gekomen?
- Zo ja, welke?
- Zo ja, in hoeverre heeft u deze kunnen toepassen in het project?
- Zo ja, in hoeverre zijn deze mogelijkheden relevant voor toekomstig onderzoek?
- Is de monitoring van het dierenwelzijn adequaat gebleken?
- Kunnen de criteria voor humane eindpunten verfijnd worden?

Voor zover mogelijk zijn de experimenten vooraf in het lab geoptimaliseerd, zodat de juiste settings/instellingen konden worden gebruikt bij de experimenten. De resultaten van de eerste acute experimenten zijn gebruikt om de settings verder te optimaliseren voor de experimenten met follow up. Door de settings van de apparatuur te optimaliseren konden we het gewenste therapeutische effect bereiken.

## 4 Strategie

- 4.1 Voldeden de diermodellen aan de verwachtingen? Licht uw antwoord toe.  
- Indien de diermodellen niet voldeden, beschrijf wanneer dit werd gesignaleerd, of de modellen zijn aangepast en of besloten is de proeven (tijdelijk) te stoppen?

Voor bijlage 1 voldeed het diermodel aan de verwachtingen. Echter voor bijlage 2 niet; de carotid body/carotis arterie ligt bij varkens vrij diep in de nek, waardoor onze apparatuur niet optimaal gebruikt kan worden. Hierdoor zou de variatie in de experimenten te groot worden. Er is na 4 proeven besloten om niet verder te gaan met dit diermodel, en te kijken naar een ander meer geschikt diermodel. Eerste pilot-experimenten (aangesloten bij andere onderzoeksgroepen) laten zien dat de geit hier een beter model voor is, vanwege de anatomie van de nek/carotis.

- 4.2 Waren de in de aanvraag beschreven keuzemomenten en de criteria op basis waarvan keuzes werden gemaakt voldoende specifiek om onnodig gebruik en/of ongerief van dieren te voorkomen?

Ja

## 5 Verworvenheden

(wat heeft het project opgeleverd?)

- 5.1 In hoeverre zijn de directe doelen van het projectvoorstel bereikt? Indien de directe doelen niet (volledig) bereikt zijn, licht toe waarom niet.

De resultaten van deze experimenten hebben ertoe geleid dat de eerste klinische studie kon worden opgestart. De experimenten zoals beschreven in dit project waren essentieel voor het kunnen starten met een klinische studie.

5.2 Zijn er nog andere waardevolle opbrengsten van het project te vermelden?

Wetenschappelijke publicatie van de resultaten (van experimenten Bijlage 1):

Groen, M. H. A. *et al.* Safety and feasibility of arterial wall targeting with robot-assisted high intensity focused ultrasound: a preclinical study. *Int. J. Hyperth.* (2020). doi:10.1080/02656736.2020.1795278

## 6 Overige aspecten

6.1 Heeft u nog verdere opmerkingen die volgens u relevant zijn voor de beoordeling achteraf van het project?

Nee

## 7 Leerpunten

7.1 Beschrijf wat voor u de belangrijkste leerpunten zijn met betrekking tot het ontwerp van en de uitvoering van toekomstige projecten.

Voor toekomstige projecten zal het aantal dieren beter kunnen worden ingeschat. Daarnaast weten we dat varkens niet geschikt zijn als diermodel in de experimenten gericht op de carotid body.

## 8 Ondertekening

8.1

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder. De ondergetekende verklaart:

- dat de beantwoording van de vragen in het formulier Beoordeling achteraf is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

[Redacted]

Datum

13-10-2022

Handtekening

[Redacted]



## Aanvulling Niet-technische samenvatting

### Beoordeling achteraf 20173566-BA

	<b>1</b> Algemene gegevens
1.1 Titel van het project	Een niet invasieve ablatie therapie door middel van ultrageluid
	<b>2</b> Gebruik dieren
2.1 Welke diersoorten zijn gebruikt?	Varkens
2.2 Hoeveel dieren zijn gebruikt?	23
2.3 Wat is het werkelijke ongerief dat de dieren hebben ondergaan?	11 terminale proef, 12 matig ongerief
	<b>3</b> Opbrengsten
3.1 Wat zijn de belangrijkste opbrengsten van het project?	<p>De resultaten van deze experimenten laten zien dat we onze techniek veilig kunnen toepassen. Op basis van de resultaten kon er een klinische studie met patiënten in het ziekenhuis worden gestart.</p> <p>Daarnaast is er ook een wetenschappelijk publicatie geschreven, waardoor andere onderzoeksgroepen ook gebruik kunnen maken van deze resultaten.</p>
	<b>4</b> Nieuwe inzichten
4.1 Zijn er nieuwe inzichten die kunnen leiden tot vervanging, vermindering en/of verfijning?	We hebben gezien dat het combineren van experimenten erg effectief is voor het verminderen van het aantal gebruikte dieren. Met de opgedane kennis kunnen we toekomstige proeven optimaliseren, zodat er bij toekomstig onderzoek minder proeven nodig zijn.
	<b>5</b> In te vullen door CCD
Publicatie datum	18-1-2024
Andere opmerkingen	