



	Dossier: AVD1080020174167	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X



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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Reuma en vermoeidheid
1.2 Looptijd van het project	2 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Reuma; Ontstekingseiwitten; Vermoeidheid; Hersenen; Neurotransmitters

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
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<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)	<u>Maatschappelijk belang</u> : Spondyloartritis (SpA) is een relatief veel voorkomende vorm van reuma, die wordt gekenmerkt door ontsteking en van de wervelkolom. Veel reumapatiënten, en i.h.b. SpA-patiënten, ervaren extreme vermoeidheid. In SpA spelen erfelijke factoren een rol. Ondanks de komst van betere geneesmiddelen, blijven helaas veel reumapatiënten last houden van extreme vermoeidheid. SpA komt in mannen meer voor dan in vrouwen, maar vrouwen met SpA hebben vaker last van vermoeidheid. Vermoeidheid zorgt voor een verminderde levenskwaliteit, hoog ziekteverzuim en een sterk verhoogd risico op arbeidsongeschiktheid bij reuma.
---	---

Probleem: Er zijn op dit moment geen medicijnen die de extreme vermoeidheid bij reuma kunnen verhelpen. Sterker nog, artsen en wetenschappers weten niet welke mechanismen verantwoordelijk zijn voor de vermoeidheid bij reuma. Daarom heeft het Reumafonds besloten het hier beschreven onderzoek mogelijk te maken.

Hypothese: Bij de reumatische aandoening spondyloartritis (SpA) zorgt een chronische verhoging van ontstekings-eiwitten voor veranderingen van signaalstoffen in de hersenen, waardoor vermoeidheid ontstaat.

Vraagstelling: (1) Kan een chronische ontsteking, zoals bij de reumatische aandoening SpA, fysieke en mentale vermoeidheid veroorzaken bij de rat? En is dit erger in vrouwelijke dieren dan in mannelijke dieren (2) Gaat deze vermoeidheid gepaard met een verschuiving in de balans tussen signaalstoffen in de hersenen van ratten?

- | | | |
|-----|---|---|
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Wij verwachten meer inzicht te krijgen in de hersenmechanismen die verantwoordelijk zijn voor de veroorzaking van vermoeidheid bij reuma. Deze kennis is nodig om in de toekomst effectieve behandeling van vermoeidheid bij reuma mogelijk te maken. |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Voor dit onderzoek zijn over de looptijd van 2 jaar maximaal 256 ratten nodig. |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | De ratten ontwikkelen een specifieke vorm van reuma, die zich kenmerkt gewrichtsontstekingen in poten en wervelkolom. Verwacht wordt dat de dieren ook last hebben van vermoeidheid. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | De verwachte ernst is gelijk voor alle dierproeven, omdat de geplande gedragstesten niet erg belastend zijn. Het is met name de reuma zelf die matig ongerief veroorzaakt. |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Na afloop van het experiment worden de ratten gedood. Verschillende weefsels, organen en hersenen worden geanalyseerd. |

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. | Door de complexiteit van vermoeidheid bij reumatische aandoeningen hebben we een levend organisme nodig om de onderliggende (hersenen)mechanismen van vermoeidheid in ratten met reuma te kunnen bestuderen. Er zijn geen <i>ex vivo</i> systemen beschikbaar die complexe interacties tussen immuuncellen, hersencellen en vermoeidheid bij een reumatische aandoening als SpA kunnen nabootsen. Helaas maakt dit de |
|-----|--|---|

vervanging van proefdieren niet mogelijk.

4.2 Vermindering

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

Optimalisatie van het SpA-diermodel, door gebruik making van éénmalige immunisatie, heeft ervoor gezorgd dat alle dieren reuma krijgen (tegenover 30% in het spontane model) waardoor er veel minder dieren nodig zijn per experiment. Door immunisatie kunnen nu ook de vrouwtjesdieren reuma krijgen, wat voorheen niet lukte in het spontane model. Door mannetjes en vrouwtjes in de experimenten te gebruiken verminderen we tevens het fokoverschot.

4.3 Verfijning

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

Immunisatie zorgt ervoor dat alle dieren reuma krijgen, en veroorzaakt tevens een versnelling van de ziekteontwikkeling, waardoor niet alleen minder dieren nodig zijn, maar ook de duur van een experiment verkort wordt wat leidt tot een kortere duur van het ongerief. Daarnaast werken we samen met onderzoekers uit het AMC die dit SpA-diermodel uitvoerig hebben geoptimaliseerd, waardoor onnodige fouten worden voorkomen en de kans op succesvol onderzoek sterk toeneemt.

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

De dieren worden gecontroleerd op gewichtsverlies en zwelling van de poten.

Als de dieren meer dan matig ongerief ondervinden, worden ze uit het experiment gehaald en gedood. Daarnaast zullen de ratten ook 1 keer per week gecontroleerd worden op complicaties die niet gerelateerd zijn aan het reuma in de ratten. Bij onvoorziën ongerief zal eerst overleg met de proefdierdeskundige plaatsvinden. Indien nodig worden deze dieren uit het experiment gehaald om verder lijden te voorkomen.

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, 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 10800 <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	Universiteit Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30275924
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	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Associate Professor
		Afdeling	Farmaceutische Wetenschappen/Farmacologie
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Assistent Professor
		Afdeling	Farmacologie/Farmaceutische Wetenschappen
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 2 - 2018 |
| Einddatum | 1 - 2 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Fatigue in spondyloarthritis: from understanding molecular mechanisms to new treatment targets.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Reuma en vermoeidheid
- 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 € 1035 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



21-11-2017



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3 Vul de titel van het project in.	Fatigue in spondyloarthritis: from understanding molecular mechanisms to new treatment targets

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project. <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier <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 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Spondyloarthritis (SpA) is de op een na meest voorkomende vorm van chronische gewrichtsontsteking (reuma). De ziekte begint eigenlijk nooit voor 12^{de} levensjaar en maar zelden na 40^{ste} levensjaar. Eenmaal ontwikkelde SpA blijft levenslang aanwezig. SpA bestaat uit een axiale vorm (axSpA), die wordt gekenmerkt door ontstekingen van de wervelkolom, bekken en sacro-iliacale (SI-) gewrichten, die door de ontsteking aan elkaar vast kunnen groeien (spondylitis ankylopoetica). Er bestaat ook een perifere vorm (peSpA), waarbij gewrichten (zoals heupen, knieën en enkels) ontstoken kunnen zijn. Ook kunnen er niet-gewrichtsgerelateerde (extra-articulaire) ontstekingen optreden in darmen, huid en ogen (Rudwaleit et al., 2009, 2011). De kwaliteit van leven bij SpA-patiënten wordt niet alleen aangetast door pijn en stijfheid van de gewrichten, maar ook door erge vermoeidheid. Tegenwoordig zijn de ontstoken gewrichten steeds beter te behandelen met medicijnen, zoals non-steroïdale anti-inflammatoire drugs (NSAIDs) en/of TNF-alpha biologicals, maar desondanks blijft de vermoeidheid vaak bestaan en ook de progressie van de ziekte wordt niet geremd (bijv. Calin et al., 1993; Lopez-Medina et al., 2016; Chauffier et al., 2013). Alhoewel bij de mens, in vrouwen SpA minder frequent voorkomt dan bij mannen, hebben vrouwen wel iets meer last van vermoeidheid dan mannen (Tournadre et al., 2013). *Het ontstaan van vermoeidheid bij reuma wordt niet goed begrepen, en op dit moment zijn er geen geneesmiddelen beschikbaar die vermoeidheid kunnen reduceren.*

Daarom gaan we onderzoek doen naar vermoeidheid in een diermodel voor SpA, waarbij in ratten chronische gewrichtsontsteking wordt opgewekt. We werken samen met het Academisch Medisch Centrum in Amsterdam (AMC), omdat ze heel veel ervaring hebben met het SpA-diermodel en het model verder hebben verfijnd en gevalideerd (Van Duivencoorde et al., 2012). De SpA-ratten zijn F1(HLA-B27/huβ2m) transgene dieren (Taurog et al., 1993, Tran et al., 2006). Door de ratten een specifieke concentratie (100µg) hitte-geïnactiveerde *Mycobacterium tuberculosis* (Mtub) in te spuiten, krijgen alle dieren (zowel m/v) een SpA-achtig ziektebeeld. In het door ons gebruikte SpA-model treedt SpA niet spontaan op! Bovendien kan met deze Mtub-injectie de start van de SpA-ziekte worden vervroegd (2-3 weken na injectie) en gesynchroniseerd tussen de dieren (van Duivencoorde et al., 2012). Eenmaal door Mtub opgewekte SpA blijft voortduren, ook als de oorspronkelijke ziekteverwekker reeds is verdwenen.

Er zijn 2 relevante vraagstellingen in SpA die we met dit projectvoorstel verder willen onderzoeken.

(1) Kan een chronische ontsteking, zoals bij de reumatische aandoening SpA, fysieke en mentale vermoeidheid veroorzaken bij de rat? En hebben vrouwelijke dieren hier meer last van dan mannelijke dieren?

Ziekteactiviteit bij axSpA in mensen is de meest krachtige voorspeller van vermoeidheid (Lopez-Medina et al., 2016; Chauffier et al., 2013), maar psychologische factoren (depressie) en slaapstoornissen kunnen ook een rol spelen (Schneeberger et al., 2015). Hoewel vermoeidheid goed correleert met de pijn die patiënten met spondylitis ankylopoetica ervaren, kunnen er verschillende mechanismen betrokken zijn bij pijn en vermoeidheid, omdat afname in pijn niet altijd gepaard gaat met vermindering van vermoeidheid (Wu et al., 2015). In overeenkomst hiermee is aangetoond dat pijn en stijfheid afneemt na NSAID-therapie, terwijl vermoeidheid blijft bestaan (Dernis-Labous et al., 2003). Ook zijn biologicals effectief in het reduceren van gewichtsonsteking, maar het effect op vermoeidheid is slechts beperkt (Almeida et al., 2016). In axSpA-patiënten die behandeld zijn met biologicals neemt de gewrichtsontsteking af, terwijl circa 80% van de patiënten last blijft houden van vermoeidheid (Bedaiwiet al., 2015). Imaging-studies van de hersenen bevestigen het bestaan van verschillende hersencircuits voor vermoeidheid en pijn in axSpA, omdat vermoeidheid gepaard gaat met veranderingen in hersengebieden betrokken bij motoriek en attentie, terwijl bij pijn andere hersengebieden actief zijn (Wu et al., 2015). Echter, de mate waarin vermoeidheid in SpA het gevolg is van gewoon chronisch ziek zijn of het gevolg is van een specifieke complicatie van de chronische ontsteking, is niet bekend.

Vermoeidheid wordt vaak over het hoofd gezien of genegeerd door artsen, die in plaats daarvan zich richten op de harde, objectieve eindpunten van de ziekte (de ontstekingen). Dit komt doordat de mechanismen van vermoeidheid bij reuma grotendeels onbekend zijn, en door het ontbreken van effectieve geneesmiddelen tegen vermoeidheid (Calin et al., 1993). Toch kan vermoeidheid niet langer worden genegeerd, omdat vermoeidheid in SpA een sterk verband houdt met een slechte levenskwaliteit (Schneeberger et al., 2015). Daarom is nieuw onderzoek nodig om de mechanismen van vermoeidheid in SpA beter te begrijpen en om nieuwe aangrijpingspunten (targets) te ontdekken voor de ontwikkeling van effectieve geneesmiddelen of specifieke voedingsmiddelen die de vermoeidheid kunnen terugdringen.

SpA-patiënten hebben vaak last van centrale vermoeidheid, die kan worden opgedeeld in mentale vermoeidheid en fysieke vermoeidheid (Chaudhuri et al., 2000). Om te bepalen of dit bij de rat met SpA ook het geval is zullen specifieke gedragstesten worden gebruikt. Uit dieronderzoek is gebleken dat fysieke vermoeidheid kan worden gemeten d.m.v. spontaan gedrag, zoals exploratie in de thuishoek, loopwielactiviteit (Harrington et al., 2012; Bonsall et al., 2015) en het meten van graafgedrag (Deacon, 2006). Mentale vermoeidheid kan worden gemeten m.b.v. "prepulse inhibition" (Van der Linden et al., 2006), specifieke cognitieve testen (Howland et al., 2012; Lorist et al., 2015) en sucrose-preferentie (Sakić B, et al., 1997). Om te onderzoeken of een verminderde fysieke mobiliteit het gevolg is van pijnlijke gewrichten, zal de helft van de dieren worden behandeld met een pijnstiller (een NSAID). Bij SpA-patiënten is gebleken dat NSAIDs en/of biologicals de vermoeidheid amper kunnen verlagen (bijv. Calin et al., 1993; Chauffier et al., 2013; Lopez-Medina et al., 2016). Desalniettemin, bestuderen we toch de effecten van de acute NSAID-behandeling op perifere en centrale ontstekingsstoffen (o.a. cytokinen).

(2) Gaat fysieke en mentale vermoeidheid gepaard met een verschuiving in de balans van dopamine en glutamaat in de hersenen van de rat?

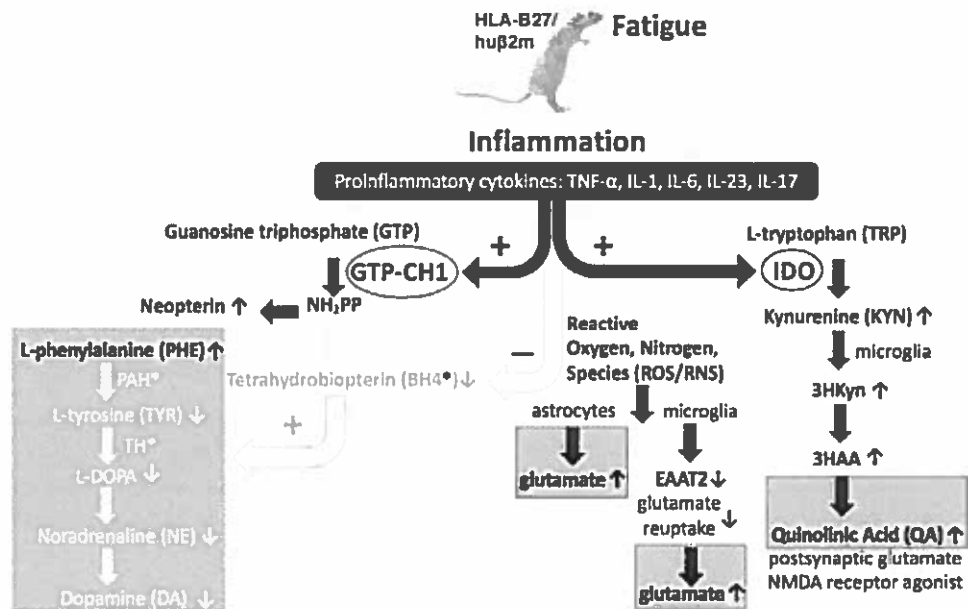
Vanuit een evolutionair standpunt kan ontstekings-geïnduceerde vermoeidheid worden uitgelegd als een adaptieve respons op de korte termijn.

Fysieke vermoeidheid kan het beloningssysteem voorzien van een signaal dat het behoud van energie de kansen op overleving verhoogt en intern of extern aangedreven motiverende staten, zoals honger, exploratie, en voortplanting moeten worden verlaagd om overleving te bevorderen.

Mentale vermoeidheid kan het cognitieve systeem een signaal geven dat het organisme aanmoedigt om de huidige doelen te verlagen of alternatieve strategieën met lagere inspanning te gaan zoeken. Echter, tijdens een chronische ziekte, in het bijzonder een autoimmuunziekte, wordt de van nature adaptieve vermoeidheidsrespons echter maladaptief, vanwege de lange duur van de ontsteking (Dantzer et al., 2014). Het is bekend dat een ontsteking kan zorgen voor een stijging van ontstekingsstoffen (cytokinen) in de hersenen, maar het is onbekend of de concentraties cytokinen in de nucleus accumbens stijgen tijdens gewrichtsontsteking. Daarom zullen deze in de hersenen van de SpA-ratten worden gemeten.

Het eerste deel van onze vraagstelling is gebaseerd op de aanname dat een chronische ontsteking zorgt voor een verlaagde dopamine afgifte:

Uit humaan onderzoek blijkt dat een ontsteking vermoeidheid kan veroorzaken, die gepaard gaat met een lagere dopaminerge neurotransmissie in het cortico-striatale netwerk, inclusief prefrontale cortex (Miller et al., 2017). Fysieke vermoeidheid is in verband gebracht met lichamelijke activiteiten die motivatie vereisen. Patiënten beschrijven fysieke vermoeidheid als "ik vind het niet leuk om het te doen, het is het niet waard", als gevolg van een lagere interne motivatie (Dantzer et al., 2014). Niet uitgesloten kan worden dat een ontsteking de beloningswaarde reduceert. De ventrale striatum (nucleus accumbens) wordt gezien als het hersengebied dat beloning, prioriteit en energie verbindt met motorische actie, kortom, motivatie. Ontstekingsziekten worden gekenmerkt door de afgifte van proinflammatoire cytokinen (zie Fig 1.). Proinflammatoire cytokinen verhogen de expressie van de enzymen guanosine-trifosfaat-cyclohydrolase-1 (GTP-CH1) en indoolamine-2,3-dioxygenase (IDO) in monocyten, macrofagen en/of microglia. Een ontsteking zorgt voor een toename in de vrije radicalen ROS (reactive oxygen species) en RNS (Reactive Nitrogen Species). Deze vrije radicalen verminderen de werkzaamheid van de cofactor tetrahydrobiopterine (BH4), omdat BH4 zeer gevoelig is voor oxidatie. BH4 is de cruciale co-factor voor de snelheidsbeperkende aminozuurmono-oxygenasen: Phenylalanine Hydroxylase; L-Tyrosine hydroxylase; en tryptofaanhydroxylase, die nodig zijn voor de omzetting van aminozuren in monoamines. Zo zal de lagere BH4 activiteit uiteindelijk resulteren in lagere dopamine niveaus in de hersenen.



Figuur 1. Hypothese: een ontsteking verlaagt dopamine, maar verhoogt glutamaat spiegels

Het tweede deel van onze vraagstelling is gebaseerd op de aanname dat een chronische ontsteking zorgt voor een verhoogde glutamaat afgifte:

Proinflammatoire cytokinen verhogen IDO-activiteit waardoor tryptofaan minder wordt omgezet in serotonine (5-HT), maar in de plaats daarvan wordt gebruikt en omgezet in worden in de kynurenine-route (zie Fig 1.). Kynurenine wordt dan omgezet in verschillende neuroactieve metabolieten, waaronder 3-hydroxykynurenine en Quinolinic acid (QA). Opmerkelijk verhoogt QA de glutamatergische neurotransmissie door postsynaptische NMDA-receptoren. De reactieve soorten, ROS en RNS, kunnen ook de astrocyten stimuleren om glutamaat vrij te geven en microglia te stimuleren om glutamaattransporters te remmen. Gezamenlijk resulteren deze acties in verhoogde glutamaterge neurotransmissie. Dit leidt tot de volgende hypothese:

Hypothese

Proinflammatoire cytokinen bij SpA-ratten (HLA-B27/huβ2m) met chronische gewrichtsontsteking (reuma) veroorzaken zowel mentale als fysieke vermoeidheid als gevolg van een daling in dopamine niveaus in de nucleus accumbens, maar een stijging in de glutamaatconcentraties in zowel de basale ganglia als in de prefrontale cortex.

Referentielijst

- Almeida C, et al., Biologic interventions for fatigue in rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;(6): art no. CD008334.
- Bedaiwi M, et al., Fatigue in Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis: Analysis from a Longitudinal Observation Cohort. *J Rheumatol.* 2015;42(12):2354-60.
- Bonsall et al., Suppression of Locomotor Activity in Female C57Bl/6J Mice Treated with Interleukin-1β: Investigating a Method for the Study of Fatigue in Laboratory Animals. *PLoS One.* 2015; 10(10):e0140678.
- Calin A, et al., Fatigue in ankylosing spondylitis - why is it ignored? *J Rheumatol.* 1993; 20(6):991-5.
- Chaudhuri A., Fatigue and basal ganglia. *J Neurol Sci.* 2000;179(5 1-2):34-42.
- Chauffier K, et al., Fatigue in spondyloarthritis: a marker of disease activity. A cross-sectional study of 266 patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2013;31(6):864-70.
- Dantzer R, et al., The neuroimmune basis of fatigue. *Trends Neurosci.* 2014;37(1):39-46.

Deacon RM. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc.* 2006; 1(1):118-21.

Dernis-Labous E, et al., Assessment of fatigue in the management of patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 2003; 42(12):1523-8.

Harrington ME. Neurobiological studies of fatigue. *Prog Neurobiol.* 2012; 99(2):93-105.

Howland JG, et al., Altered object-in-place recognition memory, prepulse inhibition, and locomotor activity in the offspring of rats exposed to a viral mimetic during pregnancy. *Neuroscience* 2012; 201:184-98.

López-Medina et al., Assessment of Fatigue in Spondyloarthritis and Its Association with Disease Activity. *J Rheumatol.* 2016; 43(4):751-7.

Lorist MM, Boksem MA, Ridderinkhof KR. Impaired cognitive control and reduced cingulate activity during mental fatigue. *Brain Res Cogn Brain Res.* 2005;24(2):199-205.

Miller AH et al., The Immunology of Behavior-Exploring the Role of the Immune System in Brain Health and Illness. *Neuropsychopharmacology.* 2017; 42(1):1-4.

Rudwaleit M et al., The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70(1):25-31.

Rudwaleit M, et al., The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(6):777-83.

Sakić B, et al., Reduced preference for sucrose in autoimmune mice: a possible role of interleukin-6. *Brain Res Bull.* 1997;44(2):155-65.

Schneeberger EE, et al., Fatigue assessment and its impact in the quality of life of patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2015;34(3):497-501.

Taurog JD, Maika SD, Simmons WA, Breban M, Hammer RE. Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *J Immunol.* 1993; 150(9):4168-78.

Tournadre A, Pereira B, Lhoste A, Dubost JJ, Ristori JM, Claudepierre P, Dougados M, Soubrier M. Differences between women and men with recent-onset axial spondyloarthritis: results from a prospective multicenter French cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013;65(9):1482-9.

Tran, T.M., et al., Additional human beta2-microglobulin curbs HLA-B27 misfolding and promotes arthritis and spondylitis without colitis in male HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum,* 2006. 54(4):1317-27.

Van der Linden D, et al., Disrupted sensorimotor gating due to mental fatigue: preliminary evidence. *Int J Psychophysiol.* 2006;62(1):168-74.

Van Duivenvoorde et al., Relationship between inflammation, bone destruction, and osteoproliferation in the HLA-B27/human beta2-microglobulin transgenic rat model of spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64(10): 3210-19.

van Heesch et al., Lipopolysaccharide increases degradation of central monoamines: an in vivo microdialysis study in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex of mice. *Eur J Pharmacol.* 2014; 725:55-63.

van Heesch F, et al. Systemic tumor necrosis factor-alpha decreases brain stimulation reward and increases metabolites of serotonin and dopamine in the nucleus accumbens of mice. *Behav Brain Res.* 2013; 253:191-5.

van Tok M, et al., Anti-IL-17A treatment blocks inflammation, destruction and new bone formation in experimental spondyloarthritis in HLA-B27 transgenic rats. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67:1283, p 981.

van Tok M, et al., *Arthritis Rheumatol* 2016;68 (suppl 10): p 3039.

van Tok M et al., Innate immune activation can trigger experimental spondyloarthritis in HLA-B27/Huβ2m transgenic rats. *Front Immunol.* 2017; 8:920.

Wu Q, et al., Tumor necrosis factor inhibitor therapy in ankylosing spondylitis: differential effects on pain and fatigue and brain correlates. *Pain.* 2015; 156(2):297-304. 6) Eimerbrink MJ, et al., Pre-treatment of C57BL/6J mice with the TLR4 agonist monophosphoryl lipid A prevents LPS-induced sickness behaviors and elevations in dorsal hippocampus interleukin-1β, independent of interleukin-4 expression. *Behav Brain Res.* 2016; 302:171-4.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Met dit projectvoorstel willen wij in een diermodel voor reuma, het SpA-diermodel, onderzoeken of fysieke en mentale vermoeidheid meetbaar is in specifieke gedragstesten, en daarna de hersenmechanismen onderzoeken die verantwoordelijk kunnen zijn voor het veroorzaken van vermoeidheid.

In dit projectvoorstel hebben we 2 specifieke vraagstellingen, namelijk:

1. Kan een chronische ontsteking, zoals bij de reumatische aandoening SpA, fysieke en mentale vermoeidheid veroorzaken? En hebben vrouwelijke dieren hier meer last van dan mannelijke dieren?
2. Gaat fysieke en mentale vermoeidheid gepaard met een verschuiving in de balans van dopamine en glutamaat in de hersenen?

In onze onderzoeksgroep zijn we me name geïnteresseerd in de invloed van het immuunsysteem op de hersenen, en de consequenties hiervan op het gedrag. Eerder hebben we laten zien dat proinflammatoire cytokinen de neurotransmitter niveaus in de hersenen kunnen veranderen en zorgen voor depressie-achtig gedrag in ratten (Heesch et al., 2013, 2014). Het hier voorgestelde onderzoek borduurt hierop verder. Internationale en nationale samenwerking (zie hieronder) maximaliseert de haalbaarheid van het project.

Internationale en nationale samenwerkingen vergroten de kans op succes, zoals: met de Afdeling Reumatische Ziektes bij Medisch Centrum UT Southwestern, Texas, USA, die een goed spondyloarthritis (SpA) diermodel hebben ontwikkeld waarbij transgene ratten gebruikt worden met humane HLA-B27 gen en de bijbehorende lichte keten. We werken ook samen met onderzoekers van Academisch Medisch Centrum (AMC). Zij hebben langdurige ervaring met het onderzoeken van SpA in de HLA-B27 ratlijnen van Dr. Taurog (Tok et al., 2015; 2016). Deze ratten ontwikkelen artritis en spondylitis die op veel manieren het spectrum van de menselijke SpA nabootsen (Tok et al., 2015; 2016; van Duivenvoorde et al., 2012).

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Wetenschappelijk belang

Het is van wetenschappelijk belang om het mechanisme te begrijpen hoe een chronische gewrichtsontsteking bij SpA, neurotransmitterspiegels in de hersenen kan veranderen waardoor fysieke of mentale vermoeidheid kan ontstaan. Vooral dopamine en glutamaat lijken betrokken te zijn bij het ontstaan van vermoeidheid. Als dit waar is en we het mechanisme beter begrijpen wordt het misschien ook mogelijk om hierop in te grijpen met medicijnen of medische voeding.

Maatschappelijk belang

Het is bekend dat vermoeidheid in reumapatiënten medeverantwoordelijk is voor een slechtere levenskwaliteit, schoolverzuim, verhoogde arbeidsongeschiktheid en werkloosheid. Op dit moment zijn de mechanismen van ontsteking gemedieerde vermoeidheid grotendeels onbekend, en er is een gebrek aan effectieve therapieën die die behandeling van vermoeidheid mogelijk maken. Daarom is ons innovatieve dieronderzoek nodig om de mechanismen van vermoeidheid bij reuma, i.h.b. spondylartritis, beter te begrijpen. Met deze fundamentele kennis kunnen nieuwe aangrijpingspunten worden ontdekt die de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen en/of voeding tegen ontstekings-geïnduceerde vermoeidheid op de lange duur mogelijk maken. Ons onderzoek is een eerste stap in de ontwikkeling van een effectieve behandeling van vermoeidheid bij reuma. Het is goed mogelijk dat van dit onderzoek ook patiënten profiteren die lijden aan vermoeidheid a.g.v. andere auto-immuunziekten. Uiteindelijk is dit goed voor zowel patiënten als ook voor de samenleving als geheel.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Diergroep 1

Fysieke vermoeidheid wordt achtereenvolgens gemeten in:

- spontane exploratie in thuishok
- loopwielactiviteit
- graaf test

Hierna worden de dieren gedood voor de meting van proinflammatoire cytokinen in bloed en hersenen, en microglia-markers in de hersenen.

Diergroep 2

Mentale vermoeidheid wordt gemeten (na eenmalige blootstelling) in:

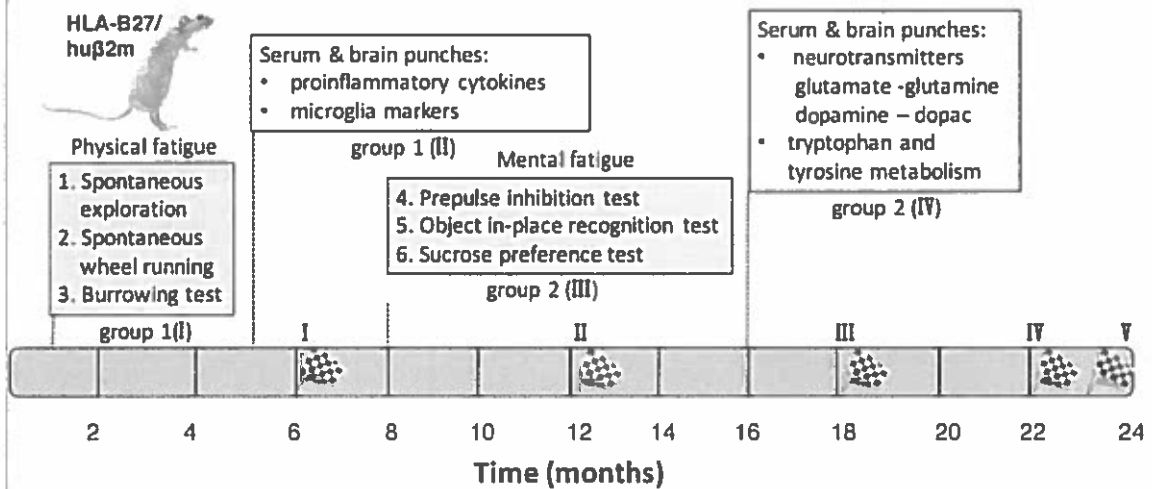
- prepulse inhibition
- object-in-place recognition
- sucrose-preferentie

Hierna worden de dieren gedood voor de meting van ontstekingsparameters in bloed en neurotransmitters en metabolieten in de hersenen.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Figuur 3. toont de tijdslijn met de testen voor gedrag die fysieke vermoeidheid meten: spontane exploratie in thuishok, loopwielactiviteit en graaf test (Diergroep 1). Deze gedragstesten duren ongeveer twee maanden en dezelfde dieren worden aan meerdere gedragstesten blootgesteld. Mentale vermoeidheid wordt gemeten in de volgende gedragstesten: prepulse-inhibition, object-in-place recognition en sucrose preferentie (Diergroep 2). Mentale vermoeidheid wordt onderzocht in twee cohorten (2x2 maanden), omdat deze tests training vereisen en daarom meer tijdrovend zijn. De factoren ontsteking (ja/nee) en pijn (ja/nee) worden ook bestudeerd. Wanneer de gedragstesten zijn voltooid, worden de dieren geëuthanaseerd (decatitatie onder pentobarbital anesthesie) om zowel specifieke cytokinen, neurotransmitters en metabolieten te meten in de dieren van Diergroep1 (cytokinen en microglia markers) en van Diergroep 2 (de neurotransmitters dopamine en glutamaat en tryptofaan

en tyrosine (inclusief metabolieten).



Figuur 3: overzicht van de verschillende gedragstesten, analyses en milestones (vlaggen)

Toelichting Figuur 3. De maanden in de figuur verwijzen naar tijdsplanning, en niet naar de leeftijd van de individuele dieren!

De gedragstesten:

I (Diergroep 1): Meting fysieke vermoeidheid tussen 1-5 maanden, waarna dieren worden gedood II (Diergroep 1): Bloed en hersenweefsel verzameld en gemeten tussen 5-12 maanden

III (Diergroep 2): Meting mentale vermoeidheid wordt 8-16 maanden, waarna dieren worden gedood. IV: (Diergroep 2): Bloed en hersenweefsel verzameld en gemeten tussen 16-22 maanden

De mijlpalen worden weergegeven als vlaggen:

I: De resultaten van dierproeven fysieke vermoeidheid zijn beschikbaar op 8 maanden II: Resultaten van cytokinen en microglia markers zijn verkrijgbaar op 12 maanden

III: De resultaten van dierproeven van mentale vermoeidheid zijn beschikbaar op 18 maanden IV: Resultaten van neurotransmitters en metabolisme zijn verkrijgbaar op 22 maanden

V: Het eindrapport is klaar na 24 maanden

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Gedragstesten voor meten van fysieke en mentale vermoeidheid
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 1v1 | Gedragsexperimenten: reuma en vermoeidheid |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

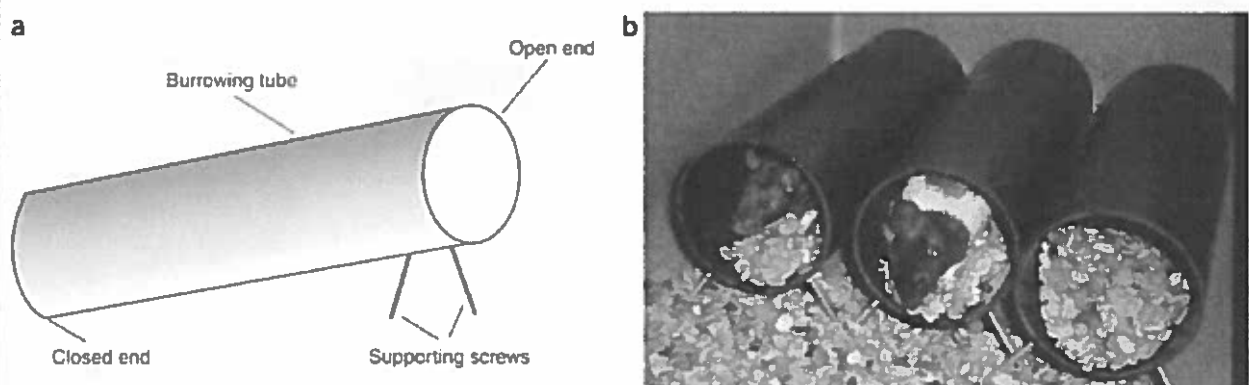
Gedragstesten voor fysieke vermoeidheid:

Fysieke vermoeidheid wordt bestudeerd door gedragstesten te doen, waarbij de ratten zelf mogen kiezen hoe lang ze willen rondlopen in een thuiskooi ("spontaneous exploration"), of in een loopwiel ("spontaneous wheel running"), of graaftest ("burrowing test") (figuur 1). Uit eerder onderzoek is gebleken dat afname in dit gedrag een gevolg kan zijn van fysieke vermoeidheid als gevolg van toename in ontstekings-eiwitten (cytokinen). De individuele F1-dieren zullen meedoen aan alle drie de gedragstesten, omdat ze niet erg belastend zijn en geen gedragstraining vereisen. Na afloop van de gedragstesten worden de dieren gedood, waarna hersenweefsel en bloed wordt verzameld om ontstekings-parameters (cytokinen en microglia) te meten in specifieke hersengebieden betrokken bij vermoeidheid (nucleus accumbens/striatum en prefrontale cortex). Verwacht wordt dat ontstekingsparameters zowel in bloed als in de hersenen zullen stijgen.

De dieren zullen tijdelijk individueel gehuisvest worden voor de duur van de verschillende gedragstesten (hieronder specifiek aangegeven). Voor en na het uitvoeren van de gedragstesten zitten de dieren in groepshuisvesting.

1. Spontane exploratie: Om spontane activiteit van de ratten te meten, zullen 8 Noldus PhenoTyper[®] kooien worden gebruikt. Dit systeem zorgt voor continue monitoring op van het diergedrag in "de thuiskooi". Elke kooi is uitgerust met een schuilplaats, voeder en water. De Noldus Ethovision[®] software is ingesteld, zodat lichaamsactiviteit in verschillende zones kan worden geanalyseerd. De volgende gegevens worden verzameld: afstand verplaatst in de kooi als afgelegde afstand over de vloer (cm), gemiddelde en maximale snelheid (cm/s). Er worden 24 uur registraties gemaakt, dit maakt het mogelijk om veranderingen in circadiaanse locomotorische activiteit te meten. Er kunnen niet meerdere dieren in een kooi worden gemeten, waardoor even individuele

- huisvesting (dus maximaal 24 uur) nodig is gedurende de duur van de test
2. Spontane loopwiel activiteit: Dezelfde 8 Noldus PhenoTyper® huiskooien, zoals hierboven beschreven, zullen worden gebruikt (opnieuw met zaagsel op de vloer), maar nu ook met een loopwiel. De tijd die in de schuilplaats wordt besteed, de tijd die wordt besteed aan de loopzone en het aantal rotaties op het loopwiel, worden gemeten. De individuele huisvesting gedurende deze test is maximaal 6 uur.
 3. Graafgedrag: Vrijwel alle knaagdieren tonen graafgedrag door spontaan een gat of een tunnel te graven (zie Fig. 1.). Perifere toediening van lipopolysaccharide (LPS), welke bekend is om proinflammatoire cytokinen te verhogen, kan ook graafgedrag reduceren. Het protocol van de graaftest wordt beschreven door Deacon, 2006. De test kan het best starten 3 uur voor de donkere periode. Zet een enkele (niet voedsel gedepriveerde) rat in elke graaftest setup voor 2 uur. De hoeveelheid materiaal die uit de buis verplaatst wordt, wordt gemeten (2500 g minus het gewicht dat in de buis achterblijft).



Figuur 1. (a) Diagram van een buis gevuld met 2500 g erwtengrind. (b) Foto van "hooded Lister rats" met graafbuis.

Gedragstesten voor mentale vermoeidheid:

Mentale vermoeidheid wordt bestudeerd in verschillende gedragstesten: de "prepulse-inhibition" test, de "object-in-place recognition" test en de sucrose preferentie test (figuur 3). Uit eerder onderzoek is gebleken proefdieren slechter presteren in deze testen door het ontstaan van mentale vermoeidheid, mogelijk als gevolg van een toename in bepaalde ontstekings-eiwitten (proinflammatoire cytokinen). De SpA-dieren zullen elk meedoen aan slechts één gedragstest, omdat deze testen langere gedragstraining vereisen en 3 gedragstesten per proefdier zou daardoor te lang duren (hierdoor meer ongerief). Een ander risico is dat de duur van de ontsteking erg verschillend is, waardoor de uitkomsten niet meer goed vergelijkbaar zijn tussen de verschillende testen. Het kan niet worden uitgesloten dat de training in de ene test, de uitkomst in de andere test zou kunnen beïnvloeden. Na afloop van de gedragstesten worden de dieren gedood, waarna hersenweefsel wordt verzameld om neurotransmitters/metaboliëten te meten in specifieke hersengebieden betrokken bij vermoeidheid (nucleus accumbens/ striatum en prefrontale cortex). Verwacht wordt dat dopamineconcentraties zullen dalen en die van glutamaat zullen stijgen in specifieke hersengebieden betrokken bij vermoeidheid.

Bij alle testen voor mentale vermoeidheid is er sprake van groepshuisvesting.

1. Prepulse inhibition: Prepulse-inhibitie van de akoestische startle-reactie (PPI) is de vermindering in de reflexgrootte wanneer een harde geluidsstimulus voorafgaat van een waarschuwingssignaal. Bij mensen wordt de mentale vermoeidheid weerspiegeld door verstoorde sensomotorische "gating"-processen, gemeten in de PPI-test. De PPI-test is zowel in mensen als in knaagdieren gevalideerd. Ons lab heeft lange ervaring met het meten van PPI in knaagdieren. Acht startle-boxen worden tegelijkertijd gebruikt (SR-lab, San Diego instrumenten, San Diego CA, USA). In korte tijd worden ratten in de testkamer geplaatst en na 5 minuten worden met startle-stimuli gepresenteerd (110 en 115 dB, 50 ms) die alleen worden voorafgegaan door geluidsprepulsen (20 ms). Er zit 100

ms tussen het begin van de prepulse en de startle-stimulus. De testsessie is opgebouwd uit 4 blokken. Blok 1 en Blok 4 bestaan uit 10 startle-stimuli (5 × 110 dB, 5 × 115 dB). Blokken 2 en 3 bestaan uit 5 presentaties, elk van 110 dB en 115 dB startle-stimuli en 5 presentaties elk van 6 verschillende prepulsen (4, 8 en 16 dB boven de achtergrond voorafgaand aan een 110 dB of 115 dB puls). Alle proeven worden gepresenteerd in een pseudorandom volgorde en de tussenproef intervallen variëren van 10 tot 20 s. Percentage prepulse-inhibitie wordt berekend voor elke prepulse-intensiteit als percentage verandering in vergelijking met het gemiddelde reflex in reactie op de 110 en 115 dB startle-stimulus.



Figuur 3. Trainings- en testfase van object-in-place recognition.

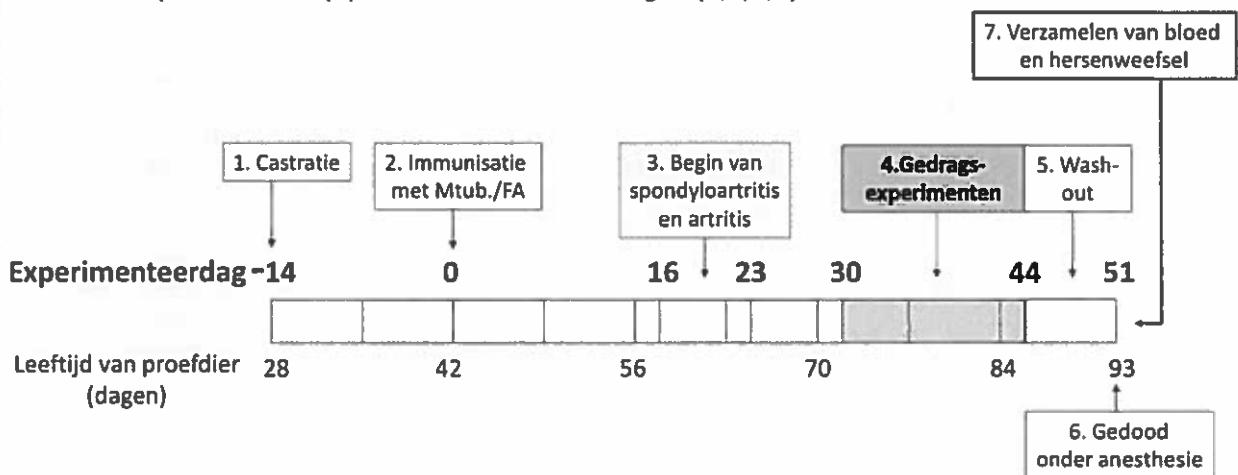
2. **"Object-in-place recognition"**: Bij aanvang van de test onderzoeken ratten vier verschillende objecten gedurende 5 minuten. Voorwerpen zijn in de vier hoeken van de arena 10 cm van elk van de dichtstbijzijnde wanden (trainingsfase). Na een 5-min pauze in thuishoek, worden de ratten terug in de arena geplaatst en blootgesteld aan vier aanvullende kopieën van de voorwerpen. Gedurende de testfase worden de posities van twee objecten echter verwisseld (testfase) (zie Fig. 3.). Alleen de twee voorwerpen aan de linkerkant van de arena of de rechterkant van de arena worden verwisseld (d.w.z. het voorste object wordt het achterste object en omgekeerd). "Object-in-place-recognition" wordt bestudeerd wanneer ratten meer tijd besteden aan het verkennen van de verwisselde objecten dan de objecten die in hun posities zijn blijven staan. Verschillende hersengebieden, mediale prefrontale cortex en hippocampus zijn betrokken bij deze test.
3. **Sucrose-preferentie test**: Normaal gesproken geven knaagdieren de voorkeur aan sucrose boven kraanwater. Afnemen sucrose-preferentie weerspiegelt de afgenomen interesse in belonende stimuli (d.w.z. anhedonia), welke ook is waargenomen tijdens ziektegedrag en depressie. In ons laboratorium is anhedonia waargenomen na stress, LPS en TNF- α toediening. In het kort, dieren kunnen 1 week lang een 1% sucrose-oplossing nuttigen om baseline-voorkeurniveaus vast te stellen. Om de sucrose-preferentie (SP) te testen worden dieren getest met twee eerder gewogen flessen die 1% sacharoseoplossing of kraanwater bevatten gedurende een periode van 1 uur. (Er vindt GEEN waterdeprivatie plaats. Mocht blijken dat dit niet werkt zal toch kortdurende (4 h) waterdeprivatie worden overwogen). De sucrosevoorkeur kan als volgt worden beschreven:

$$SP = \frac{\text{sucrose intake (g)}}{\text{sucrose intake (g)} + \text{water intake (g)}} \times 100$$

Bovendien is de absolute sacharose-inname (g) de gewogen sacharose-oplossing per rat. De relatieve sacharose-inname (g/g) is de absolute sacharose-inname per gram lichaamsgewicht van de rat.

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

In onderstaande Figuur 2 worden de beoogde behandelingen (1,2) weergegeven die nodig zijn voor het creëren van SpA-diermodel (3) en de verdere verrichtingen (4,5,6,7)



Figuur 2. De verschillende behandelingen in SpA- en controledieren.

1. Castratie: Alle HLA-B27/hu β 2m σ mannelijke ratten kunnen spontaan epididymis-orchitis (100%, vanaf 3 maanden) ontwikkelen en SpA verschijnselen zoals artritis (70%, vanaf 4 maanden) en spondylitis (30%, vanaf 7 maanden). Dit kan worden voorkomen door castratie op de leeftijd van 28 dagen, waardoor deze mannetjes niet spontaan SpA/artritis en geen epididymis-orchitis kunnen krijgen.
2. Mtub./FA-injectie: Op de leeftijd van 42 dagen worden de F1-dieren éénmalig geïmmuniseerd met een hitte-geïnactiveerde Mycobacterium tuberculosis (Mtub.) (100 μ g) in 100 μ l incomplete Freud's adjuvant (FA) subcutaan in de staartbasis.
3. De immunisatie heeft als voordeel dat alle dieren SpA/artritis krijgen (ook de vrouwtjes) en dat de gewrichtsontsteking gesynchroniseerd wordt en begint tussen experimenteedagen 16-23. Dit heeft als grote voordeel dat de totale duur van het experiment relatief kort is omdat in alle dieren op ca. leeftijd 72 dgn. de ontsteking een plafondwaarde heeft bereikt vanaf experimenteer dag 30.
4. Gedragstesten voor fysieke en mentale vermoeidheid. De dieren zullen getest worden tussen experimenteedagen 37-44. Eventuele training zal plaatsvinden tussen experimenteedagen 30-37.
5. Voor de gedragstesten krijgt de helft van de dieren een acute subcutane injectie met de NSAID (Carprofen 5 mg/kg). De wash-out periode is ervoor om het farmacon uit het bloed te laten verdwijnen.
6. Na afloop van het experiment worden de dieren eerst verdoofd met pentobarbital, waarna ze worden gedood door decapitatie.
7. Hierna worden bloed en hersenweefsel verzameld voor de meting van proinflammatoire cytokinen perifeer en centraal (o.a. in nucleus accumbens en prefrontale cortex). Tevens zal microglia worden gemeten in deze hersengebieden.

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

In verschillende behandelgroepen wordt fysieke en mentale vermoeidheid gemeten.

Tabel 1. De verschillende behandelgroepen

<u>Man</u>	<u>Reuma</u> (na Mtub./FA-injectie)	<u>Geen Reuma</u>
Pijnstilling	N=8	N=8
Geen Pijnstilling	N=8	N=8
<u>Vrouw</u>		
Pijnstilling	N=8	N=8
Geen Pijnstilling	N=8	N=8

De individuele dieren worden aan alle drie de testen voor fysieke vermoeidheid blootgesteld, terwijl dieren maar een enkele maal wordt blootgesteld aan een van de drie testen voor mentale vermoeidheid.

Fysieke vermoeidheid: Uit de literatuur bleek dat laagste Effect size ($d=1.6$) werd gevonden voor de graaftest (andere gedragstesten scoorden vrijwel hetzelfde); vervolgens is de groepsgrootte berekend met G-Power3: Effect size $d = 1.6$; Alpha = 0.05; Power = 0.8; dit resulteert in een Sample size van $N = 8$. In Tabel 1 is te zien dat we 3 factoren bestuderen, namelijk man/vrouw, wel/niet pijnstilling en wel/niet SpA/arthritis. Dit zorgt ervoor dat in totaal $N=64$ HLA-B27/hu β_2m dieren nodig zijn ($N=32$ per sekse) voor de uitvoering van 1 gedragstest.

Mentale vermoeidheid: Uit de literatuur bleek dat ook nu weer de laagste Effect size ($d=1.6$) was voor alle drie gedragstesten voor mentale vermoeidheid; vervolgens is de groepsgrootte berekend met G-Power3: Effect size $d = 1.6$; Alpha = 0.05; Power = 0.8; dit resulteert in een Sample size van $N = 8$. De dieren worden maar 1x blootgesteld aan een van de 3 gedragstesten voor mentale vermoeidheid. Dus in totaal zijn $N = 3 \times 64 = 192$ F1-dieren met HLA-B27/hu β_2m genotype nodig.

In totaal zijn dus $64 + 192 = 256$ dieren nodig.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoorten: HLA-B27/hu β_2m ratten (zowel σ als ρ)

Herkomt: F1-generatie van fok in GDL, Utrecht.

Alleen de F1-generatie ratten zullen worden blootgesteld aan de verschillende gedragstesten

Geschatte aantallen: 256 (128 HLA-B27/hu β_2m σ ratten en 128 HLA-B27/hu β_2m ρ ratten)

Levensstadia: 0-93 dagen

Keuzes zijn gebaseerd op verschillende behandelingen aangegeven onder A (zie Tabel 1).

Fokparen zijn nodig voor het creëren van de F1-generatie. Deze fokparen krijgen zelf niet spontaan enige vorm van reuma. Castratie van F1-mannetjes voorkomt het optreden bijbal- en teelbalontsteking.

Vervolgens geldt dat de F1-generatie alleen reuma kan ontwikkelen na immunisatie.

Voor de volledigheid worden de Fokparen hieronder beschreven:

Twee transgene rattenlijnen zijn nodig: HLA-B27/hu β_2m (+/wt) + tg (hemizygoot; lijn 21-3) vrouwen x hu β_2m + tg (homozygoot; lijn 283-2) mannen. Beide transgene lijnen hebben een "Inbred Lewis rat" achtergrond.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Bij de afweging zijn alle drie de V's meegenomen:

Vervanging: Door de complexiteit van vermoeidheid bij reumatische aandoeningen hebben we een levend organisme nodig om de onderliggende (hersens)mechanismen van vermoeidheid in ratten met reuma te kunnen bestuderen. Er zijn geen ex-vivo systemen beschikbaar die complexe interacties tussen immuuncellen, hersencellen en vermoeidheid bij een reumatische aandoening als SpA kunnen nabootsen. Helaas maakt dit de vervanging van proefdieren niet mogelijk.

Vermindering: Optimalisatie van het SpA-diermodel, door gebruikmaking van éénmalige immunisatie, heeft ervoor gezorgd dat alle dieren reuma krijgen (tegenover 30% in het spontane model) waardoor er veel minder dieren nodig zijn per experiment. Door immunisatie kunnen nu ook de vrouwtjesdieren reuma krijgen, wat voorheen niet lukte in het spontane model. Door mannetjes en vrouwtjes in de experimenten te gebruiken verminderen we het fokoverschot.

Verfijning: Immunisatie zorgt ervoor dat alle dieren reuma krijgen, en veroorzaakt tevens een versnelling van de ziekteontwikkeling, waardoor niet alleen minder dieren nodig zijn, maar ook de duur van een experiment verkort wordt wat leidt tot een kortere duur van het ongerief.

Daarnaast werken we samen met onderzoekers van het AMC die dit SpA-diermodel uitvoerig hebben geoptimaliseerd, waardoor onnodige fouten worden voorkomen en de kans op succesvol onderzoek sterk toeneemt.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met knaagsticks en Pvc-buizen om bescherming en kooiverrijking te bieden. Alle HLA-B27 positieve F1 mannelijke proefdieren ondervinden gering ongerief omdat ze op een leeftijd van 4 weken worden gecastreerd onder pijnstilling en anesthesie (resp. 5 mg/kg Rimadyl en isofluraan en 1 l/min O₂), zodat de anders pijnlijke epididymis-orchitis zich niet zal ontwikkelen. Ook krijgen deze gecasteerde F1-mannen niet meer spontaan artritis/SpA. Bij de vrouwtjes treedt er sowieso nooit spontane artritis/SpA op.

Matig ongerief treedt op na injectie met Mtub./FA in HLA-B27/huβ_{2m} mannen en vrouwen F1-ratten als gevolg van gewrichtsontsteking en verwachte vermoeidheid. De helft van de dieren krijgt acute pijnstilling door subcutane toediening van een NSAID (Carprofen, 5 mg/kg) kort voor het gedragsexperiment.

De dieren worden gehuisvest in een gesloten D1 of, indien nodig vanwege gebruik van gedragsexperimenten in een DMII-omgeving. Weefsels en monsters die genomen worden van deze ratten worden in een gesloten container verplaatst naar het lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Tijdens de gedragsexperimenten worden de dieren individueel gehuisvest, omdat het niet anders kan voor deze gedragstesten. Na de gedragstest zullen de dieren weer teruggeplaatst worden in de groeps huisvesting. Vanwege de korte duur heeft dit minimaal negatief effect voor dierenwelzijn.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De F1-mannen worden gecastreerd onder pijnstilling (5 mg/kg Rimadyl) en anesthesie (isofluraan en 1 l/min O₂).

De helft van de F1-dieren krijgen alleen Carprofen (NSAID) als pijnstilling om de invloed van pijn op de gedragstesten voor vermoeidheid te bestuderen. Helaas kunnen we niet een chronische behandeling met een NSAID toepassen, omdat dit de chronische ontsteking zal onderdrukken.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Niet meer dan de beoogde artritis en vermoeidheid

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

nvt

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

Na de gedragstesten zullen de dieren 1 week daarna worden gedood door decapitatie onder pentobarbital anesthesie, omdat het acute effect van de NSAID (Carprofen) dan is verdwenen.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Scoren van ziekte symptomen: drie keer per week worden de ratten gewogen en gescoord voor artritis (0-3 per pootje; 0 = geen zwelling, 1 = zwelling van 1 gewricht, 2 = zwelling van >1 gewricht, 3 = zwelling van alle gewrichten) en spondylitis severity (0-3: kleine korstjes, milde zwelling [kleine bulten] of grote zwelling [grote bulten]).

Ratten worden vroegtijdig getermineerd door het bereiken van de volgende humane eindpunten:

- 1. Verlaging in het lichaamsgewicht van >10% in vergelijking met de vorige meting
- 2. Verlaging in het lichaamsgewicht van >20% in vergelijking met het hoogst gemeten gewicht in dezelfde rat.
- 3. Een volledig gezwollen voorpoot (score 3 voor betreffende voorpoot), waardoor het dier niet in staat is goed voor zichzelf te zorgen. (P.S. Als bij een lagere score in verschillende poten/gewrichten blijkt dat het dier hierdoor niet in staat is om te drinken of eten wordt het dier ook uit het experiment gehaald).
- 4. Wanneer de ratten onafhankelijk van geïnduceerde reuma, ziek worden, zullen we in overleg met de IvD beslissen of een dier vroegtijdig uit de studie moet worden gehaald.

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

Vanwege de relatieve korte duur van het experiment wordt niet verwacht dat er dieren uitvallen a.g.v. reuma, maar men moet desondanks op alles voorbereid zijn

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Alle dieren ondervinden matig ongerief als gevolg van reuma in de F1-vrouwtjes en gecasteerde F1-mannetjes na antigeen-challenge met Mtub/FA.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Anders zouden de dieren onnodig lang lijden aan reuma. Verder worden de hersenen verwijderd voor verder onderzoek. De transgene dieren hebben een heel specifiek genotype waardoor ze niet gebruikt kunnen worden door andere onderzoekers.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Ja > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

De dieren worden na de laatste gedragstesten gedood, door decapitatie tijdens pentobarbital-geïnduceerde anesthesie.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.I.858.014
2. Titel van het project : Fatigue in spondyloarthritis: from understanding molecular mechanisms to new treatment targets
3. Titel van de NTS : Reuma en vermoeidheid
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: 18-09-2017
 - aanvraag compleet:
 - in vergadering besproken: 04-10-2017
 - anderszins behandeld:
 - termijnonderbreking(en) van / tot : 11-10-2017/25-10-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD: 20-11-2017
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: 11-10-2017
 - Datum antwoord: 25-10-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- Algemeen: de DEC raadt u om de fok uit de aanvraag te verwijderen. Hoewel het een fok met ongerief voor de mannetjes betreft, wordt dit ongerief weggenomen door de castratie en is het niet nodig de fok in de aanvraag op te nemen. De DEC raadt u wel aan dit te vermelden in de aanvraag, bijvoorbeeld bij 'B. De Dieren'. Bovendien telt de castratie mee bij de inschatting van het ongerief. *Zoals aangeraden is de fok verwijderd uit de aanvraag. Wel is onder 'B. De Dieren' uitgelegd dat ongerief bij de F1-mannetjes wordt voorkomen door castratie en de fokpaartjes zelf geen ongerief ondervinden omdat ze geen reuma ontwikkelen vanwege hun bijzondere verschillende genotype (vrouw x man).*

Bijlage 1

- B. De dieren: Bij dierproef III klopt het aantal dieren niet. Bij punt A staat het overigens wel correct. Bij het samenvoegen met dierproef II graag hier op letten.
Sectie herschreven en nu klopt het aantal dieren wel.
 - D. Vervanging, vermindering en verfijning: Bij dierproef II is de onderbouwing voor Vermindering en Verfijning wat gering. Graag duidelijker weergeven dat alle drie de V's worden meegenomen.
Op advies van DEC duidelijker rekening gehouden met de 3 V's en beter omschreven.
 - J. Humane eindpunten: Bij dierproef II wordt niet aangegeven bij welke score het humane eindpunt is bereikt. Graag alsnog weergeven.
Nu ook score humane eindpunt aangegeven: (ontsteking voorpoot (score 3)).
 - L. Wijze van doden: Bij dierproef II staat 'nee' aangevinkt bij de vraag of het een methode volgens de richtlijn is, maar dit moet zijn 'ja'. De zin er onder dient te worden verwijderd.
Nu ja aangevinkt.
- 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. Spondyloartritis (SpA) is een vorm van reuma, die wordt gekenmerkt door ontsteking en vergroeiing van de wervelkolom en de gewrichten tussen heiligbeen en beide bekkenbeenderen. Dit uit zich vaak in pijn en stijfheid in knie, enkel, heup, rug, nek, onderrug en (afgewisseld) de billen. Veel reumapatiënten, en in het bijzonder SpA-patiënten, ervaren extreme vermoeidheid. Hoewel de ontstoken gewrichten steeds beter te behandelen zijn met medicijnen, blijft de vermoeidheid vaak bestaan. De mate waarin vermoeidheid bij SpA-patiënten het gevolg is van het chronisch ziek zijn of het gevolg is van een specifieke complicatie van de chronische ontsteking, is niet bekend. Er is nog maar weinig bekend over de mechanismen van vermoeidheid bij reuma en ook ontbreken effectieve geneesmiddelen tegen vermoeidheid, met als gevolg dat vermoeidheid vaak niet wordt onderkend door artsen. In dit project wordt daarom onderzoek gedaan naar vermoeidheid in een diermodel voor SpA, waarbij in ratten chronische gewrichtsontsteking wordt opgewekt. Aan de hand van een tweetal vraagstellingen zullen met behulp van dit model de onderliggende hersenmechanismen, die vermoedelijk ten grondslag liggen aan de vermoeidheid, in kaart gebracht worden.

De relatie tussen het hoofddoel en de twee vraagstellingen komt in grote lijnen overeen met voorbeeld 4B uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project'. De wijze waarop de twee vraagstellingen met elkaar verweven zijn is door de aanvrager helder toegelicht in de projectaanvraag. Per vraagstelling is duidelijk welke handelingen de individuele dieren zullen ondergaan en welke mate van ongerief deze handelingen tot gevolg zullen hebben. Dit alles in ogenschouw nemend is de DEC van mening dat de voorliggende aanvraag als een toetsbaar en haalbaar project beschouwd dient te worden.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het verkrijgen van meer inzicht in de hersenmechanismen die verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van de vermoeidheid bij SpA en het ontdekken van nieuwe targets voor de ontwikkeling van effectieve geneesmiddelen of specifieke voedingsmiddelen die de vermoeidheid kunnen terugdringen. Het uiteindelijke doel van het project is het ontwikkelen van een effectieve behandeling voor vermoeidheid bij SpA. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. Het directe doel is gerechtvaardigd in de context van dit onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doelgroep/patiënten met SpA en de onderzoekers. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en

integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ervaren. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden.

Voor de SpA-patienten geldt dat er momenteel geen behandeling en/of medicatie mogelijk is om de extreme vermoeidheid bij reuma te verhelpen. Het is zelfs niet bekend welke mechanismen verantwoordelijk zijn voor deze vermoeidheid. Meer inzicht in de mechanismen kan het ontwikkelen van een therapie of medicijn tegen deze vermoeidheid in de toekomst wellicht mogelijk maken, waardoor de kwaliteit van leven van reumapatiënten aanzienlijk wordt bevorderd.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.

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 onderzoeksgroep heeft ervaring met onderzoek naar de invloed van het immuunsysteem op de hersenen, en de consequenties hiervan op het gedrag en de fysieke en mentale gesteldheid. Dit projectvoorstel borduurt voort op de kennis die is opgedaan tijdens een promotieproject naar de rol van ontstekingen bij depressie, waarbij is aangetoond dat proinflammatoire cytokinen de afbraak van serotonine en dopamine in de hersenen versterken en anhedonie veroorzaken. Internationale en nationale samenwerking met andere universiteiten dragen eveneens bij aan de haalbaarheid van het project. De DEC acht kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen m.b.t. de dierproeven ruim voldoende en verwacht dat de doelstellingen behaald kunnen worden, en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu onnodige negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. In de aanvraag is duidelijk uiteengezet met behulp van welke onderzoeksstappen en – technieken de twee onderzoeksvragen beantwoord zullen worden. De DEC is van mening dat deze twee onderzoeksvragen logisch met elkaar samenhangen en terecht onderdeel zijn van een en hetzelfde project, omdat zij samen een goed beeld schetsen van het mogelijke verband tussen chronische ontsteking, verhoogde ontstekingswitten en een verschuiving in de balans tussen signaalstoffen en vermoeidheid. De ratio, samenhang en fasering van de verschillende experimenten zijn duidelijk toegelicht. Er is uitgelegd waarom er geen sprake is van een go/no-

go moment en dat de experimenten onafhankelijk van elkaar uitgevoerd worden. De DEC is derhalve van mening dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

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 grotendeels gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Alleen tijdens de gedragsexperimenten worden de dieren individueel gehuisvest, omdat het anders niet mogelijk is om per individueel dier metingen te verrichten. Na de gedragstest zullen de dieren weer teruggeplaatst worden in groepshuisvesting.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Met name het induceren van de reuma en de gevolgen daarvan (gewrichtsontsteking en verwachte vermoeidheid) wordt naar de mening van de DEC terecht ingeschat als het toebrengen van matig ongerief (geldt voor alle dieren). Het castreren van de mannelijke dieren, de gedragstesten en het tijdelijke solitair huisvesten tijdens deze gedragstesten veroorzaken licht ongerief.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek (gedragmatig) en mentaal aangetast. Als gevolg van de reuma kan fysieke en mentale vermoeidheid ontstaan en de gewrichtsontsteking maakt bewegingen pijnlijk, waardoor de dieren eveneens minder goed in staat zijn hun natuurlijk gedrag te vertonen. De integriteit van de mannelijke dieren wordt daarnaast fysiek aangetast als gevolg van de castratie.
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. De onderzoekers maken gebruik van verschillende criteria, waaronder een scoringsstelsel voor symptomen van

de ziekte en een procentuele verlaging van het lichaamsgewicht t.o.v. de vorige meting (>10%) of t.o.v. het hoogst gemeten gewicht (>20%). Men gaat er, vanwege de relatieve korte duur van het experiment, niet vanuit dat er dieren voortijdig uit het experiment genomen moeten worden.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Dit onderzoek gaat uit van de hypothese dat een chronische verhoging van ontstekingswitten zorgt voor veranderingen van signaalstoffen in de hersenen, waardoor vermoeidheid ontstaat. De nog op te helderen interactie tussen immuuncellen, hersencellen en vermoeidheid bij een reumatische aandoening als SpA is dusdanig complex, dat dit niet *in vitro* of *in silico* nagebootst kan worden.
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. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren worden statistische methoden toegepast. Het gebruik van het SpA-diermodel leidt ertoe dat alle dieren, door een immunisatie, reuma krijgen en er derhalve geen technische uitval is, ten opzicht van het spontane model waarbij slechts 30% van de dieren reuma krijgt. Ook kunnen in het SpA-diermodel zowel mannelijke als vrouwelijke muizen gebruikt worden, iets wat in het spontane model niet mogelijk is omdat de vrouwelijke dieren geen reuma ontwikkelen.
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. Zoals bij C15 aangegeven krijgen alle dieren in het SpA-model reuma als gevolg van de immunisatie. Bijkomend voordeel van dit model is dat door de immunisatie de gewrichtsontsteking gesynchroniseerd wordt en tevens zorgt voor een versnelling van de ziekteontwikkeling. Hierdoor kan de duur van het experiment beperkt blijven en daarmee ook het ongerief. Samenwerking met een instelling die het model geoptimaliseerd heeft, zal leiden tot een zo goed mogelijke toepassing van het model.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood om verder (onnodig) lijden, als gevolg van de reuma, te voorkomen en vanwege het uitnemen van de hersenen voor post mortem onderzoek. Omdat de transgene dieren een heel specifiek genotype hebben waardoor ze niet gebruikt kunnen worden voor ander onderzoek, zullen de 'overtollige' dieren uit de fok gedood

worden. 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 morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is: rechtvaardigt het belang van het voorliggende onderzoek, dat tot doel heeft inzicht te verkrijgen in de hersenmechanismen die verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van vermoeidheid bij SpA en nieuwe targets te ontdekken voor de ontwikkeling van effectieve geneesmiddelen of specifieke voedingsmiddelen die de vermoeidheid kunnen terugdringen, 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 de hersenmechanismen die verantwoordelijk kunnen zijn voor het veroorzaken van vermoeidheid en de onderliggende hypothese opgehelderd worden. Met behulp van deze resultaten kunnen mogelijk nieuwe aangrijpingspunten (targets) ontdekt worden, waarmee men verder onderzoek kan doen naar de ontwikkeling van effectieve geneesmiddelen of specifieke voedingsmiddelen die de vermoeidheid kunnen terugdringen. De DEC kent hier veel gewicht aan toe. Patiënten zouden hier zeer bij gebaat zijn, omdat momenteel behandeling van de vermoeidheid niet mogelijk is. De kwaliteit van leven van deze patiënten zou aanzienlijk verbeterd kunnen worden wanneer wel een therapie beschikbaar komt. De DEC kent hier ook veel gewicht aan toe.

Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstellingen behaald zullen 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 het verkrijgen van meer inzicht in de hersenmechanismen die verantwoordelijk zijn voor de veroorzaking van vermoeidheid bij SpA en het ontdekken van nieuwe targets voor de ontwikkeling van een therapie die de vermoeidheid kan terugdringen, een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. Het project is goed

en helder opgezet, de verschillende onderzoeksvragen zijn terecht ondergebracht in één project, en het is aannemelijk dat de gekozen strategie en experimentele aanpak, binnen de gestelde termijn, kunnen leiden tot het behalen van het doel binnen het kader van het project. Vanwege de ervaring van de onderzoeksgroep en de nationale en internationale samenwerking die is aangegaan, is het in de ogen van de DEC reëel dat de resultaten uit dit project op termijn bij kunnen dragen aan het uiteindelijke doel van dit project. Hoewel de integriteit van de mannelijke dieren aanzienlijk wordt aangetast door de castratie, is de DEC overtuigd van het belang hiervan, namelijk het beperken van het ongerief. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat vervangingsalternatieven niet mogelijk zijn. De DEC is ervan overtuigd dat het gekozen model leidt tot vermindering van het aantal benodigde dieren en dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag gerechtvaardigd is.

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

Universiteit Utrecht

Postbus 80125

3508 TC 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

AVD1080020174167

Bijlagen

2

Datum 24 november 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 november 2017. Het gaat om uw project "Fatigue in spondyloarthritis: from understanding molecular mechanisms to new treatment targets.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1080020174167. 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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:
24 november 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020174167

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
24 november 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020174167

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
Postbus: 80125
Postcode en plaats: 3508 TC UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Associate Professor
Afdeling: Farmaceutische Wetenschappen/Farmacologie
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Assistant Professor
Afdeling: Farmacologie/Farmaceutische Wetenschappen
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:

24 november 2017

Aanvraagnummer:

AVO080020174167

Over uw project

Geplande startdatum:

1 februari 2018

Geplande einddatum:

1 februari 2021

Titel project:

Fatigue in spondyloarthritis: from understanding molecular mechanisms to new treatment targets.

Titel niet-technische samenvatting:

Reuma en vermoeidheid

Naam DEC:

DEC Utrecht

Postadres DEC:

Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.035,-

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:

21 november 2017



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80011
3508 TA 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
AVD1080020174167
Bijlagen
2

Datum 24 november 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 november 2017
Vervaldatum: 24 december 2017
Factuurnummer: 174167
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1080020174167	€ 1.035,00

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@zho-ccd.nl
 To: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
 Cc: [REDACTED]
 Subject: Aanhouden AVD1080020174167
 Date: dinsdag 19 december 2017 15:16:03

Geachte [REDACTED]

Op 22-11-2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Fatigue in spondyloarthritis: from understanding molecular mechanisms to new treatment targets." met aanvraagnummer AVD1080020174167. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

- Het is voor de CCD niet volledig duidelijk hoe lang een dier te maken heeft met individuele huisvesting. Bij welke gedragstesten is deze individuele huisvesting noodzakelijk? Hoe lang worden de dieren in het totaal individueel gehuisvest?
- In de sucrose-preventie test wordt beschreven dat dieren een 6 uur durende waterdeprivatie ondervinden. Kunt u uitleggen waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstelling?
- U geeft aan dat het door immunisatie mogelijk is zowel mannelijke als vrouwelijke dieren in te zetten in het project. Dit voorkomt mogelijk fokoverschot. De CCD waardeert dit. Echter is er wel een castratie noodzakelijk die voor deze mannelijke dieren ongerief oplevert. Kunt u uitleggen of en waarom het gebruik van twee geslachten noodzakelijk is voor het behalen van de doelstelling?
- De Niet-technische samenvatting (NTS) bevat ruim 900 woorden in plaats van de in de richtlijn aangegeven 500 woorden. Wij verzoeken u sectie 3.1 van de samenvatting in te korten en de nieuwe versie van de NTS toe te sturen.
- De NTS bevat in enkele gevallen verhullend taalgebruik en verkleinwoorden (bijvoorbeeld diervriendelijke gedragstesten, ontstekingsstofjes en pootjes). De CCD adviseert u dit te vermijden en dit in de NTS aan te passen.
- In de NTS is aangegeven dat de projectduur een looptijd van 2 jaar heeft. Ook is deze looptijd weergegeven in figuur 3 van het projectvoorstel. Echter, in het aanvraagformulier staat de looptijd van 01-02-2018 tot 01-02-2021 vermeld. Wilt u de gewenste looptijd in de verschillende formulieren met elkaar in overeenstemming brengen?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven



www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Beantwoording vragen CCD over project “Fatigue in spondyloarthritis: from understanding molecular mechanisms to new treatment targets” met nr. AVD1080020174167.

- In de nieuwe versie is duidelijk aangegeven wanneer er sprake is van individuele huisvesting, de noodzaak en de duur.
- 2/3 van de gepubliceerde studies maakt gebruik van waterdeprivatie en 1/3 niet. We gaan nu proberen het zonder waterdeprivatie te doen, mocht blijken dat het zonder waterdeprivatie toch niet (goed) gaat, dan wordt alsnog de opzet aangepast. Dit is nu aangepast in de nieuwe documenten.
- Zoals reeds aangegeven, in projectvoorstel 3.4/ en in bijlage (onder D), gebruiken wij castratie op de leeftijd van 4 weken omdat dit voorkomt dat de HLA-B27/huβ2m ♂ ratten spontaan epididymis-orchitis (zeer pijnlijk!) ontwikkelen of spontaan SpA verschijnselen krijgen.
- Het klopt dat niet duidelijk was aangegeven waarom ook vrouwelijke dieren worden onderzocht. Alhoewel bij de mens, in vrouwen SpA minder frequent voorkomt dan bij mannen, hebben vrouwen wel iets meer last van vermoeidheid dan mannen (Tournadre et al., 2013). Dit is nu verwerkt in nieuwe versie.
- Op advies van CCD is 3.1 van de NTS sterk ingekort
- Op advies van CCD zijn in de NTS: pootjes vervangen door poten; diervriendelijke gedragstesten vervangen door gedragstesten; en ontstekingsstofjes vervangen door ontstekingsstoffen
- In de nieuwe formulieren zijn de looptijden in overeenstemming gemaakt doordat op aanvraagformulier de looptijd nu 1-02-2018 – 1-02-2020 is.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[REDACTED]

Postbus 80125

3508 TC 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
AVD1080020174167
Bijlagen
1

Datum 23 januari 2018

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 22 november 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Fatigue in spondyloarthritis: from understanding molecular mechanisms to new treatment targets." met aanvraagnummer AVD1080020174167. 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 1 februari 2018 tot en met 1 februari 2020. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat dit door de aanvrager is aangepast.

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

Voorwaarden

Aan de vergunning hebben wij voorwaarde(n) verbonden op grond van artikel 10a1 lid 2 van de wet. Deze voorwaarde(n) vindt u in het deel 'Projectvergunning' van dit besluit. Onder 'Overwegingen' lichten wij toe waarom wij deze voorwaarde(n) aan de vergunning verbinden.

Procedure

Datum:
23 januari 2018
Aanvraagnummer:
AVD1080020174167

Advies dierexperimentencommissie

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is ontvangen op 22 november 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Nadere vragen aanvrager

Op 19 december 2017 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op de totale duur van de individuele huisvesting, onderbouwing van de noodzaak voor waterdeprivatie ten behoeve van de sucrose-preventie test, onderbouwing van het gebruik mannelijke en vrouwelijke dieren, tekstuele aanpassingen in de NTS en de looptijd op de verschillende formulieren met elkaar in overeenstemming brengen. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Datum:
23 januari 2018
Aanvraagnummer:
AVD1080020174167

Voorwaarden

De aanvraag is gericht op het onderzoeken of fysieke en mentale vermoeidheid meetbaar is in een SpA-diermodel, met als doel hersenmechanismen te ontdekken die verantwoordelijk kunnen zijn voor het veroorzaken van vermoeidheid. Voor het bereiken van de doelstelling worden een aantal gedragstesten ingezet, waaronder de sucrose-preventie test. Wij hebben u in het kader van dierenwelzijn gevraagd of de sucrose-preventie test uitgevoerd kan worden zonder een voorafgaande 6-uur durende waterdeprivatieperiode. Op basis van relevante literatuur is door u de waterdeprivatie als handeling voorafgaand aan de test verwijderd uit de aanvraag. In de aanvraag staat vermeld: "Mocht blijken dat dit niet werkt zal toch kortdurende (4 h) waterdeprivatie worden overwogen." Indien het voor het behalen van de doelstelling noodzakelijk is om tot toepassing van waterdeprivatie over te gaan, dient u dit in het kader van dierenwelzijn voorafgaand aan de toepassing in een wijzigingsaanvraag ter goedkeuring aan de CCD voor te leggen. Waterdeprivatie wordt beschouwd als een huisvestingsvorm anders dan omschreven in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU. Om deze reden hebben we een voorwaarde toegevoegd aan de vergunning.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

Meer informatie

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

Datum:
23 januari 2018
Aanvraagnummer:
AVD108002017+167

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

**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: Universiteit Utrecht
Adres: Postbus 80125
Postcode en plaats: 3508 TC UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2018 tot en met 1 februari 2020, voor het project "Fatigue in spondyloarthritis: from understanding molecular mechanisms to new treatment targets." met aanvraagnummer AVD1080020174167, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate Professor. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 22 november 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 8 januari 2018;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Gedragsexperimenten: reuma en vermoeidheid, zoals ontvangen op 8 januari 2018;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 8 januari 2018;
 - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 22 november 2017
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 januari 2018.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Gedragsexperimenten: reuma en vermoeidheid			
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	256	100,0% Matig

Voorwaarden

Bijzondere voorwaarden

U dient in het kader van dierenwelzijn voorafgaand aan het toepassen van waterdeprivatie een wijzigingsaanvraag ter goedkeuring aan de CCD voor te leggen. De CCD zal op basis van de door u aangeleverde motivatie opnieuw een schade baten analyse te maken voor dit onderdeel (WOD artikel 10a2, lid 2 onderdeel d). U mag pas de waterdeprivatie toepassen zodra u van de CCD goedkeuring heeft gekregen hiervoor.

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.

Aanvraagnummer:
AVD1080020174167

- 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:
AVD1080020174167

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën **terminaal, licht, matig of ernstig**. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder **algehele of plaatselijke verdoving** wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:

AVD1080020174167

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.

