

	Dossier: AVD10800202317226	
		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	n.v.t
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Identificeren van nieuwe mogelijkheden voor de behandeling van leverontstekingen en van leverkanker
NTS-identificatiecode	NTS-NL-900147 v.1, 16-01-2024
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Leverziektes Vetten Stofwisseling Levercellen
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Gastro-intestinaal stelsel met inbegrip van de lever

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Hoe leververvetting , leverontsteking , leveruitval door vorming van littekenweefsel, en leverkanker precies ontstaat, is niet bekend. De oorzaken zijn waarschijnlijk complex, mede veroorzaakt door de verschillende celtypen en structuur van de lever. Belangrijke cellen die een rol spelen bij het optreden van leverontsteking zijn de hepatische stellaatcellen (HSCs). Deze HSC cellen komen maar in kleine hoeveelheden voor in de lever (ongeveer 5%), maar spelen wel een belangrijke sleutelrol in de werking van de lever. In de gezonde lever komen de HSCs in een ‘rustende’ vorm voor en zijn ze verantwoordelijk voor de vitamine A-opslag in de lever. Tijdens het ontstaan van leverontsteking worden de stellaatcellen geactiveerd en zijn ze onder andere verantwoordelijk voor de vorming van het littekenweefsel in de lever. Er is weinig bekend over hoe de verandering plaatsvindt van een rustende HSC naar een geactiveerde HSC, maar de verwachting is dat de vorming van leverontsteking kan worden geremd als deze ‘switch’ geblokkeerd kan worden. . HSCs zijn moeilijke cellen om mee te werken. Er zijn geen cellijnen van de rustende HSCs.</p> <p>Er wordt op dit moment veel onderzoek gedaan naar de communicatie tussen de verschillende levercellen en naar de rol van het lever-skelet dat de levercellen op zijn plaats houdt en daarmee de communicatie tussen de cellen kan beïnvloeden, en ook naar de veranderingen daarin tijdens leverziektes. Er is vrijwel niets bekend over de rol van kleine stofjes en vetten die betrokken zijn bij de communicatie tussen levercellen. Door nieuwe technische ontwikkelingen kan nu de uitwisseling van stofjes zoals vetten tussen de verschillende levercellen voor het eerst onderzocht worden waarmee de communicatie tussen deze cellen onderzocht kan worden. Ook kan het lever-skelet nu goed nagebootst worden waarbij het nep-skelet dezelfde stijfheid en andere eigenschappen heeft als het echte lever-skelet.. Hierdoor kunnen levercellen in deze nagebootste lever-skeletten gekweekt worden waardoor de kweekomstandigheden dichterbij de natuurlijke omstandigheden komen .</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas	<p>De getallen zijn veelzeggend: 40% van de wereldbevolking heeft overgewicht of leidt aan obesitas. Als gevolg daarvan is niet-alcoholische leververvetting (NAFLD) een snelgroeiend gezondheidsprobleem: leververvetting is wereldwijd de meest voorkomende leverziekte en maar liefst 20 tot 25% van de volwassen wereldbevolking is daardoor getroffen. In de meeste gevallen leidt leververvetting niet tot gezondheidsklachten, maar het is wel risicoverhogend voor vervolgstadia met ernstige gevolgen. In 25% van de patiënten leidt NAFLD tot leverontsteking (NASH), wat de kans op ernstige leverschade (levercirrose) en leverkanker verhoogt ((Schwabe et al., 2020). Ondanks de ernst van de situatie is er geen enkel medicijn voorhanden om deze ziektebeelden (NAFLD en NASH, laat staan levercirrose en leverkanker) succesvol te behandelen. Levertransplantatie is daardoor nog steeds de enige optie voor behandeling na vergevorderde ontwikkeling van deze ziekten. De verwachting is dat deze situatie alleen maar ernstiger wordt door de ongezonde eet- en leefgewoonten van toekomstige generaties. Ook bij dieren kan leververvetting een belangrijke rol spelen. Bij katten is leververvetting een aandoening die vooral voorkomt bij dieren met overgewicht</p>

worden bereikt nadat het project is afgerond).

(obesitas.) De leververvetting kan acuut levensbedreigend zijn als de kat stopt met eten of als ze op dieet worden gezet. Bij melkkoeien speelt leververvetting vooral een rol bij de geboorte van een kalf en de melkproductie. De melkproductie komt op gang bij de geboorte van een kalf en voor de melkproductie worden veel vetten uit het vetweefsel van de koe gehaald. Er zijn aanwijzingen dat een deel van deze vetten ophoopt in de lever (leververvetting) wat de vruchtbaarheid van de koe negatief kan beïnvloeden.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Voor de isolatie van verschillende levercellen worden de dieren onder narcose gebracht, waarna het bloed uit de lever wordt gespoeld met vloeistof, waarna de levercellen uit de lever kunnen worden gehaald. . Tijdens deze handelingen wordt de bloeddorstroming in de dieren onderbroken waardoor ze tijdens deze procedure overlijden.</p>																				
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Niet van toepassing op de dieren na de leverperfusie. Deze muizen worden gedood terwijl ze nog onder narcose zijn.</p>																				
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="424 645 703 768" rowspan="2">Soort:</th> <th data-bbox="711 645 799 768" rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4" data-bbox="807 645 1548 689"><i>Geraamde aantallen naar ernstgraad</i></th> </tr> <tr> <th data-bbox="807 701 991 768"><i>Terminaal</i></th> <th data-bbox="999 701 1177 768"><i>Licht</i></th> <th data-bbox="1185 701 1364 768"><i>Matig</i></th> <th data-bbox="1372 701 1548 768"><i>Ernstig</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="424 779 703 857">Muizen (Mus musculus)</td> <td data-bbox="711 779 799 857">1108</td> <td data-bbox="807 779 991 857">1108</td> <td data-bbox="999 779 1177 857">0</td> <td data-bbox="1185 779 1364 857">0</td> <td data-bbox="1372 779 1548 857">0</td> </tr> </tbody> </table>					Soort:	Totaal aantal	<i>Geraamde aantallen naar ernstgraad</i>				<i>Terminaal</i>	<i>Licht</i>	<i>Matig</i>	<i>Ernstig</i>	Muizen (Mus musculus)	1108	1108	0	0	0
Soort:	Totaal aantal	<i>Geraamde aantallen naar ernstgraad</i>																			
		<i>Terminaal</i>	<i>Licht</i>	<i>Matig</i>	<i>Ernstig</i>																
Muizen (Mus musculus)	1108	1108	0	0	0																
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="424 891 799 1014" rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3" data-bbox="807 891 1548 1014"><i>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</i></th> </tr> <tr> <th data-bbox="807 1025 1054 1081"><i>Hergebruikt</i></th> <th data-bbox="1062 1025 1305 1081"><i>Teruggeplaatst</i></th> <th data-bbox="1313 1025 1548 1081"><i>Geadopteerd</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="424 1025 799 1081"></td> <td data-bbox="807 1025 1054 1081"></td> <td data-bbox="1062 1025 1305 1081"></td> <td data-bbox="1313 1025 1548 1081"></td> </tr> </tbody> </table>					Soort:	<i>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</i>			<i>Hergebruikt</i>	<i>Teruggeplaatst</i>	<i>Geadopteerd</i>									
Soort:	<i>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</i>																				
	<i>Hergebruikt</i>	<i>Teruggeplaatst</i>	<i>Geadopteerd</i>																		
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De dieren overlijdens tijdens de leverperfusie omdat dit tot onherstelbare schade aan het normale functioneren van dit orgaan leidt.</p>																				

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Er zijn geen alternatieven voorhanden voor het werken met hepatische stellaatcellen die geïsoleerd worden uit de lever (de primaire hepatische stellaatcellen). De stellaatcellen die uit de lever worden geïsoleerd hebben unieke eigenschappen die verdwijnen op het moment dat je ze probeert te kweken. Bij alle beschikbare cellijnen die voortkomen uit stellaatcellen zijn de unieke eigenschappen zoals ze die in een normale lever hebben, in meer of mindere mate verdwenen en lijken daarmee op geactiveerde stellaatcellen.

Er zijn ook geen modelsystemen voorhanden die de werking van de lever zodanig nabootsen dat een betrouwbaar NASH- of leverkankermodel kan worden nagebootst voor bijvoorbeeld het medicijnonderzoek in dergelijke systemen.

Er wordt veel onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van medicijnen tegen leverontsteking en leverkanker en het onderzoek beschreven in dit project moet een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van in-vitrosystemen, zodat in de toekomst veel van dit onderzoek gedaan kan worden zonder dat er dieren gedood moeten worden.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Waar mogelijk wordt er gebruik gemaakt van organoïden, zodat er geen levers worden gebruikt voor de isolatie van dit type cellen (hepatocyten). Ook voor de andere celtypen zal gebruikt worden gemaakt van cellijnen, indien voorhanden. De levers worden vooral gebruikt voor de isolatie van hepatische stellaatcellen in hun rustende fenotype.

Ook zullen de levers gebruikt worden om te controleren of de resultaten die verkregen zijn met co-kweek systemen lijken op de processen zoals die in de lever plaatsvinden.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

We volgen de bestaande richtlijnen voor het huisvesten en onder narcose brengen van knaagdieren.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

De processen van leververvetting en leverontsteking in muizen lijken op die in mensen. Hierdoor is de kennis uit onderzoek aan muizen goed toepasbaar voor leverziektes bij mensen. De muizen gebruiken we voor het ontwikkelen van een meer natuurgetrouw kweekmodel. We kiezen hiervoor

de muis als model proefdier, omdat we ook over organoïden beschikken die oorspronkelijk uit muizen zijn geïsoleerd. Deze minilever-achtige orgaantjes zijn in het laboratorium te kweken en te vermenigvuldigen, en hiervoor zijn dan ook geen nieuwe dierproeven voor nodig. Een andere reden voor het gebruik van stamcellen uit muizen is dat er veel muizen beschikbaar zijn met gerichte genetische veranderingen (mutanten) in specifieke genen, waardoor de rol van die genen bij leverontsteking onderzocht kan worden.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--



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 neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

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	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Universiteit Utrecht	
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50
		Postcode en plaats	3584CJ UTRECHT
		Postbus, postcode en plaats	80125 3508TC UTRECHT
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Onderzoeker-Docent
		Afdeling	Department of Biomechanical Health Sciences
		Telefoonnummer	

1.5	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
1.6	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	E-mailadres	
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569
		E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>	
		<input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	5 - 9 - 2023
		Einddatum (t/m)	4 - 9 - 2028
3.2	Wat is de titel van het project?	Rol van metaboliëten in leverfibrose en leverkanker	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Identificeren van nieuwe mogelijkheden voor de behandeling van leverontsteking en leverkanker	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
		Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Factuurgegevens

- 4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.
- Naam: UU-ASC Afdeling:
 Straat: Huisnummer:
 Postcode: Plaats:
 Postbus: 80.011 Postcode: 3508TA Plaats: UTRECHT
 E-mail: asc.factuur@uu.nl
- 4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.
- Ordernummer:
 CB.841910.3.01.011

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1
- 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 en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)
- Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C 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

Utrecht

Datum

10 - 07 - 2023

Handtekening



Formulier

Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.1 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3 Vul de titel van het project in.	Identificeren van nieuwe mogelijkheden voor de behandeling van leverontsteking en van leverkanker

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project?	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input 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 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

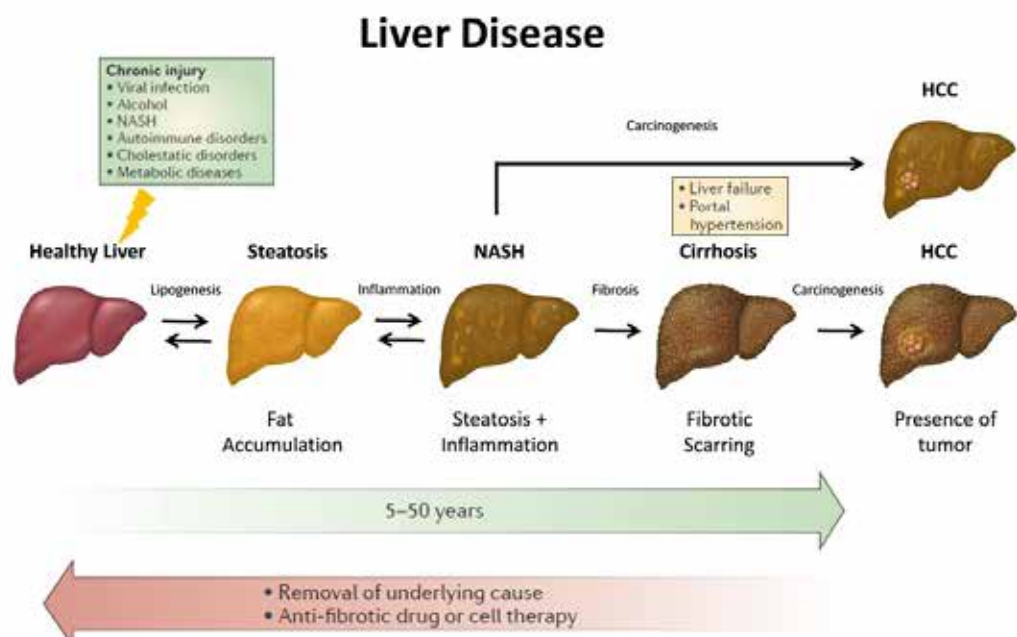
3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Vorming van de extracellulaire matrix in de lever (fibrose) en het soms daaropvolgende onomkeerbare proces van het afsterven van levercellen en het vervangen van functionele levercellen door littekenweefsel (cirrose), zijn veel voorkomende ernstige pathologieën bij mens en dier. Verschillende oorzaken die leverschade induceren, bijv. hepatitis C of metabole ziektes zoals leververvetting (NAFLD/MAFLD) (zie voor oorzaken Figuur 1), kunnen uiteindelijk leiden tot leverfibrose (Figuur 1). Chronische leverziektes vormen wereldwijd een toenemend probleem, waarbij de virale oorzaken afnemen en NAFLD als oorzaak toeneemt (Paik et al, 2022). Reeds 25% van de volwassen wereldbevolking is getroffen door NAFLD en in ongeveer 20% van deze gevallen

leidt dit tot leverfibrose (NASH), een ontstekingsreactie in de lever. In de USA is reeds 4% van de volwassen bevolking getroffen door deze ziekte (Younossi et al 2018). De explosieve toename in het aantal mensen met obesitas (oorzaak van leverschade die valt onder metabool syndroom, Figuur 1) zal dit percentage alleen doen laten toenemen in de komende jaren. NASH is nu al de op een na hoogste aanleiding voor levertransplantatie (Younossi et al 2018). Nationaal en internationaal wordt veel onderzoek verricht naar NASH (pubmed search keyword NASH geeft over de laatste 10 jaar 35.563 hits). Echter, onderzoek naar de rol van een belangrijke speler de hepatische stellaatcel (HSC) in het ontstaan van NASH is zeer beperkt (pubmed search keyword NASH and HSC geeft over de laatste 10 jaar 274 hits). Onze groep levert een unieke bijdrage aan dit onderzoek door de focus op de bestudering van lipid en metaboliet metabolisme tijdens NALFD en NASH door een combinatie van factoren. Ten eerste heeft de groep een lange en unieke track record op het onderzoek naar hepatische stellaat cellen die een cruciale rol spelen bij de ontwikkeling van NASH. Ten tweede heeft de groep een unieke expertise opgebouwd op het bestuderen van veranderingen in lipiden metabolisme in het algemeen en in het bijzonder tijdens de activatie van hepatische stellaat cellen Ten derde heeft de groep de beschikking over een unieke centrale onderzoeksfaciliteit waarin op een geïntegreerde manier zowel lipidomics als metabolomics uitgevoerd kan worden, alsmede door middel van bioinformatics analyse de data uitputtend geanalyseerd kunnen worden.



Pellicoro, A. (2014) *Nat. Rev. Imm.*

Turchinovich et al (2018) *Front. Physiol.*

Figuur 1: ontwikkeling van leverziekten (Steatose, NASH, Cirrose, en leverkanker (HCC))

Bij het ontstaan van leverfibrose is een unieke populatie van levercellen betrokken, de z.gn. hepatische stellaatcellen (Batalier en Brenner, 2005). Onder normale ("rustende") omstandigheden zijn deze cellen betrokken bij de opslag van retinol (Vitamine A). In de stellaatcellen is retinol opgeslagen in de vorm van retinylesters in lipide druppels, een speciaal cellulair organel betrokken bij de opslag en afgifte van vetachtige stoffen. Deze lipide druppels bevatten naast retinylesters ook triacylglycerol en cholesterolesters (Blaner et al, 2009). Na het ontstaan van NAFLD en/of leverschade en het daaropvolgende reparatieproces worden de stellaatcellen geactiveerd. Ze verliezen daarbij hun lipide druppels (afbraak door lipases) evenals vitamine A, en gaan een aantal groeifactoren en extracellulaire matrix eiwitten uitscheiden. Het vitamine A kan als belangrijk signaal molecuul fungeren, bijvoorbeeld als retinoïnezuur, maar de precieze rol van retinoïnezuur in leverschade en herstel is nog onduidelijk. De geactiveerde stellaatcellen spelen een belangrijke rol in het herstel na leverschade. Geactiveerde stellaatcellen spelen, als de oorzaak van de leverschade te lang aanhoudt, ook een rol bij het verergeren van de leverpathologie. In dit laatste geval leidt het uitscheiden van teveel

matrix eiwitten, bijvoorbeeld collageen, die bindweefsel vormen tot vermindering van de doorbloeding (doordat ze contraheren rond de vaten). Eigen onderzoek laat zien dat er enorme metabole veranderingen plaatsvinden in de hepatische stellaatcellen tijdens het activatie proces *in vitro* (Molenaar et al., 2023), wat blijkt uit dynamische veranderingen in lipide druppels en specifieke opname van meervoudig onverzadigde vetzuren. Initiële experimenten uit eigen onderzoek laat zien dat ook de interactie met hepatocyten een belangrijke rol speelt bij de activatie van hepatische stellaatcellen.

De lever is opgebouwd uit repeterende eenheden, de leverlobjes, die de essentiële functies van de lever in detoxificatie van het bloed, stof metabolisme, glucose opslag en galzout-productie mogelijk maken. Een gezonde lever heeft slechts een zeer beperkte extracellulaire matrix (ECM) die noodzakelijk is voor de ruimtelijke structuur. De extracellulaire matrix in de gezonde lever wordt gevormd door hepatocyten en cholangiocyten en dus niet door hepatische stellaatcellen (Drew and Machesky, 2021). De samenstelling van de ECM verandert sterk tijdens de ontstekingsreactie en tijdens de vorming van leverkanker (Arteel and Naba, 2020). Bij deze veranderingen spelen de hepatische stellaatcellen wel een belangrijke rol en zijn ze belangrijk zowel voor het ontstaan van deze ziektes als ook voor de mogelijke behandelingen. Initiële experimenten uit eigen onderzoek laten zien dat *vice versa*, de ECM ook een belangrijke rol speelt bij de activatie van hepatische stellaatcellen. De in dit projectvoorstel beschreven *in vitro* experimenten hebben als doel meer inzicht te krijgen in het activatie mechanisme van HSCs en de cross-talk met andere cellen in de lever bij het ontstaan van leverziekten/kanker.

Referenties:

Arteel G.E. and Naba A. The liver matrisome – looking beyond collagens. *J. Hepatology Reports*. 2020, (2) 1-14

Batalier R. and Brenner D.A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2005 (15) 209-218

Blaner W.S, O'Byrne S.M. et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized droplet for retinoid storage. *Biochim. Biophys. Acta* 2009 (1791) 467-473

Drew J. and Machesky L.M. The liver metastatic niche: modelling the extracellular matrix in metastasis. *Dis. Model Mech.*, 2021, (14) 1-13

Molenaar M.R. Haaker M.W., Vaandrager A.B., Houweling M. and Helms J.B. Lipidomic profiling of rat hepatic stellate cells during activation reveals a two-stage process accompanied by increasing levels of lysosomal lipids. *J. Biol. Chem.* 2023 (299) 1-14

Paik J.M., Kabbara K. Eberly K.E., Younossi Y., Henry L, and Younossi Z.M. Global burden of NAFLD and chronic liver disease among adolescent and young adults. *Hepatology* 2022, (75) 1204-1217

Younossi Z.M., Henry I., Bush H. and Mishra A. Clinical and economic burden of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.* 2018, (22) 1-10

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Er zijn een viertal doelstellingen geformuleerd die moeten bijdragen aan het ophelderen van moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan van leverontsteking en leverkanker. Deze kennis moet het mogelijk maken om behandelingen van leverontsteking en van leverkanker te ontwikkelen. Nieuwe ontwikkelingen in het onderzoeksgebied, in combinatie met resultaten uit voorlopige experimenten maken het mogelijk de volgende vier doelstellingen te adresseren, gebaseerd op de betrokkenheid en veranderende

samenstelling van verschillende celtypen, hun interactie en hun ruimtelijke ordening, die allen een belangrijke rol spelen bij het ontstaan van leverontsteking en leverkanker:

i) De mechanismen van activatie van hepatische stellaatcellen (HSCs). HSCs spelen een belangrijke rol bij het ontstaan van NASH en andere leverziekten. Onze initiële resultaten laten zien dat we voor het eerst in staat zijn om zowel rustende als geactiveerde HSCs in kweek te houden, een belangrijke mijlpaal is ons onderzoek waardoor bijvoorbeeld HSC-subpopulaties nauwkeurig gekarakteriseerd kunnen worden. Vervolgens kan bepaald worden of de overgang van de ene naar de andere subpopulatie beïnvloed kan worden door het toevoegen van inhibitoren om zodoende het ontstaan van NASH en leverkanker te remmen. De doelstelling is om lipidenmetabolisme gerelateerde eiwitten te selecteren die tijdens het activatie proces van de HSC van activiteit of hoeveelheid veranderen. Vervolgens zal de rol van deze geselecteerde eiwitten in het activatie proces van de HSCs bestudeerd worden door i) cellen te isoleren uit KO-muizen en/of ii) cellen te kweken in af- en aanwezigheid van eiwit-specifieke remmers.

ii) De communicatie van HSCs met andere levercellen. Onze eerdere onderzoeken hebben laten zien dat tijdens het HSC-activatie proces er veel verandert in de lipiden samenstelling: vitamine A verdwijnt en onverzadigde vetzuren worden tijdelijk ingebouwd. Deze signaalstoffen kunnen zowel de HSCs als andere levercellen beïnvloeden. De rol van onverzadigde vetzuren en vitamine A derivaten zullen daarom onderzocht worden bij de activatie van HSCs en bij het ontstaan van leverontsteking en leverkanker. In vervolg studies (geen onderdeel van deze projectaanvraag) zullen deze processen beïnvloed worden door remmers, activatoren, of door het geven van geschikte voedingssupplementen, waardoor een bijdrage geleverd kan worden aan het voorkomen van leverziekten. Doelstelling: het bestuderen van de functie van onverzadigde vetzuren en vitamine A derivaten bij de activatie van HSCs (autocriene regulatie) en bij de communicatie van de HSCs met omringende levercellen (bijv. hepatocyten).

iii) Ten derde willen we een Transwell co-kweek systeem ontwikkelen die de lever structuur zo goed mogelijk nabootst. Doelstelling 3A, het ontwikkelen van een "NASH in a dish model". Daartoe worden hepatocyten (lever cellen), hepatische stellaatcellen (vorming ECM tijdens ontstekingsreactie) en lever macrofagen (Kupffer cellen, voor de ontstekingsreactie) onder verschillende omstandigheden samengebracht om de optimale kweekomstandigheden voor het induceren van NASH te bepalen. De volgende parameters, zullen worden geanalyseerd om de inductie van NASH vast te stellen: 1) hepatocyten, aspartate aminotransferase (AST) in het medium (indicatie voor cel schade) en de hoeveelheid triacylglycerol (klinisch; > 5% van de hepatocyten heeft TAG ophoping bij NASH), Kupffercellen, interleukine-6 (ontstekingsmarker) en 3) HSC, collageen productie als maat voor de vorming van de ECM. Na het succesvol opzetten van het NASH-model zal dit model gebruikt worden om targets te identificeren die betrokken zijn in de pathogenese van NASH en deze dan vervolgens te valideren (doelstelling 3B). Het in vitro systeem heeft als voordeel dat de ontwikkeling van NASH en leverkanker (zie doelstelling-4) nauwkeurig bestudeerd kunnen worden. Centraal staat het ophelderen van de communicatie tussen de verschillende celtypen. Initiële experimenten laten zien dat het mogelijk is de cellen na co-kweek in een Transwell systeem efficiënt van elkaar te scheiden waardoor voor het eerst de metabole interacties van en tussen de verschillende celtypen bestudeerd kunnen worden.

iv) De interactie van HSCs met hepatocyten in leverkanker. In de lever worden fibroblast-achtige cellen (geactiveerde HSCs) in nauwe associatie met leverkanker cellen gevonden en deze cellen spelen een belangrijke rol in de response van hepatocyten uit leverkanker op anti-kanker medicijnen (Liu et al 2021). Zeer recente data laten zien dat verschillende subpopulaties van HSCs zowel bescherming kunnen bieden bij het ontstaan van HCC als ook het ontstaan van HCC kunnen bevorderen (Filliol et al 2022). Deze kennis is essentieel voor het ontwikkelen van medicijnen tegen leverkanker. Doelstellingen: het opzetten van een "liver-cancer in a dish" model en dit vervolgens te gebruiken voor het identificeren en valideren van targets, zoals eiwitten (m.b.v., genexpressie-profiling) en metabolieten (m.b.v., metabolomics) die een rol spelen in de pathogenese van leverkanker.

Referenties:

Filliol A, et al. Opposing roles of hepatic stellate cell subpopulations in hepatocarcinogenesis. Nature 2022 (610) 256-365

Liu, J. et al. Cancer-associated Fibroblasts provide a stromal niche for liver cancer organoids that confers trophic effects and therapy resistance. Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. 2021 (11) 407-431

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

De haalbaarheid van de doelen wordt gewaarborgd door gebruikmaking van i) bestaande en bewezen technieken voor de isolatie van primaire levercellen (Doelstelling 1); ii) voorlopige onderzoeksresultaten uit de eigen onderzoeksgroep waaruit blijkt dat hepatische stellaatcellen in de rustende staat gekweekt kunnen worden door gebruikmaking van een geschikt ECM (Doelstelling 1, 2 en 3); iii) cellijnen die afstammen van geactiveerde stellaatcellen en van leverkanker (Doelstelling 1,2 en 3); iv) voorlopige onderzoeksresultaten uit de eigen onderzoeksgroep waaruit blijkt dat het mogelijk is om onder de juiste kweekcondities alle drie de celtypen (hepatocyten, hepatische stellaatcellen en Kupffer cellen) gezamenlijk te kweken en tevens deze cellen snel en kwantitatief van elkaar te scheiden (Doelstelling 3); v) het co-cultuursysteem (doelstelling-4) is reeds opgezet en wordt gebruikt in Rotterdam, waar we deze expertise momenteel leren.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Chronische leverziekten vormen wereldwijd een toenemend probleem, waarbij de virale oorzaken afnemen en leververvetting (NAFLD) als oorzaak toeneemt. Reeds 25% van de volwassen wereldbevolking is getroffen door NAFLD en in ongeveer 20% van deze gevallen leidt dit tot leverfibrose (NASH), een ontstekingsreactie in de lever. In de USA is reeds 4% van de volwassen bevolking getroffen door deze ziekte (Younossi et al 2018). De explosieve toename in het aantal mensen met obesitas zal dit percentage alleen doen laten toenemen in de komende jaren. NASH is nu al de op een na hoogste aanleiding voor levertransplantatie (Younossi et al 2018). Ondanks de ernst van de situatie is er geen enkel medicijn voorhanden om deze ziektebeelden (NAFLD en NASH, laat staan levercirrose en leverkanker) succesvol te behandelen. Ook bij dieren (katten, koeien) kan leververvetting een belangrijke rol spelen in de pathologie. De verwachting is dat ook bij huisdieren (katten, honden) het probleem van leververvetting zal toenemen door een verhoogde incidentie van obesitas.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

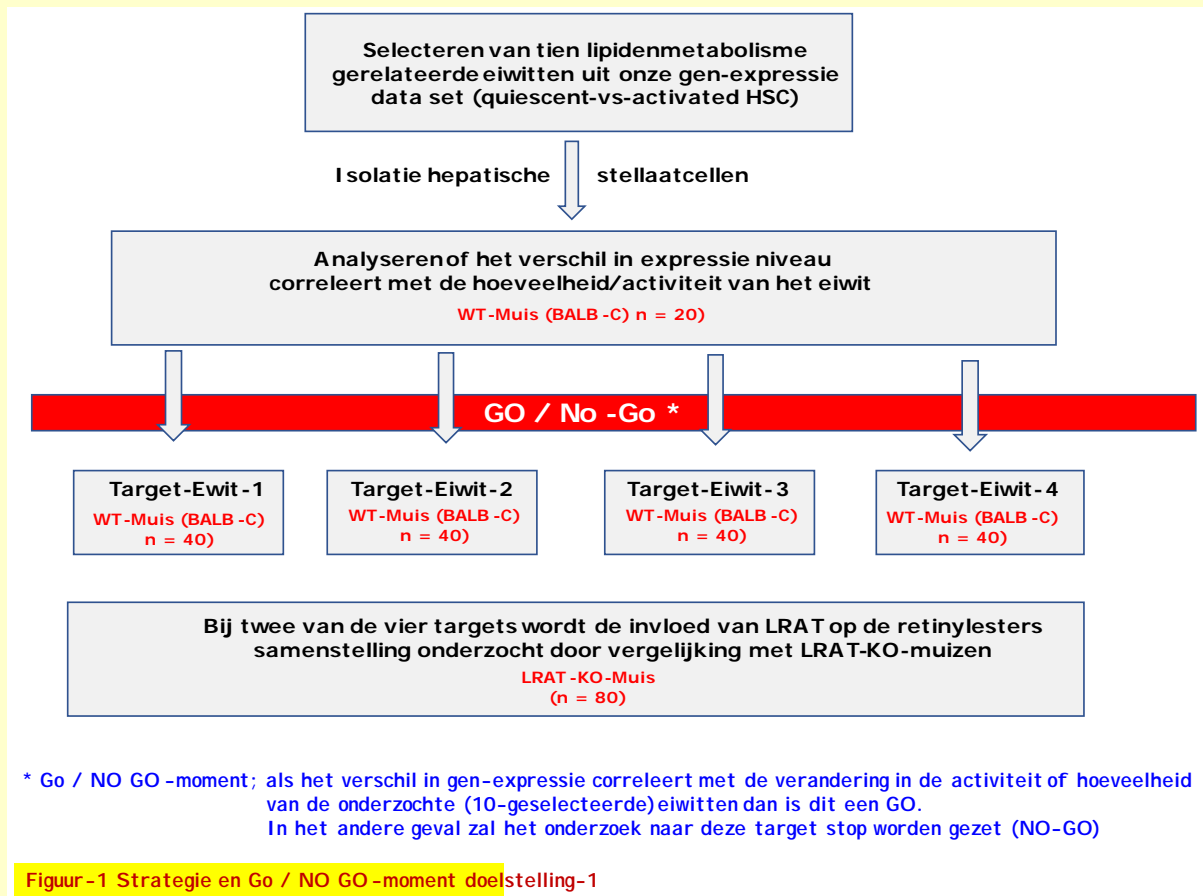
- Mens en dier als direct belanghebbenden voor behandeling van NASH en leverkanker.
- Proefdieren, het ontwikkelen van geschikte in vitro systemen (NASH in a dish) zal leiden tot een reductie van het aantal proefdieren benodigd om doelstellingen 3B en 4 te behalen.
- Wetenschap voor het ophelderen van moleculaire mechanismen die een rol spelen in gezonde en zieke lever
- De farmaceutische industrie die met behulp van de nieuwe inzichten nieuwe behandelmethoden kan gaan ontwikkelen voor de bestrijding van NASH en leverkanker

3.4 Strategie

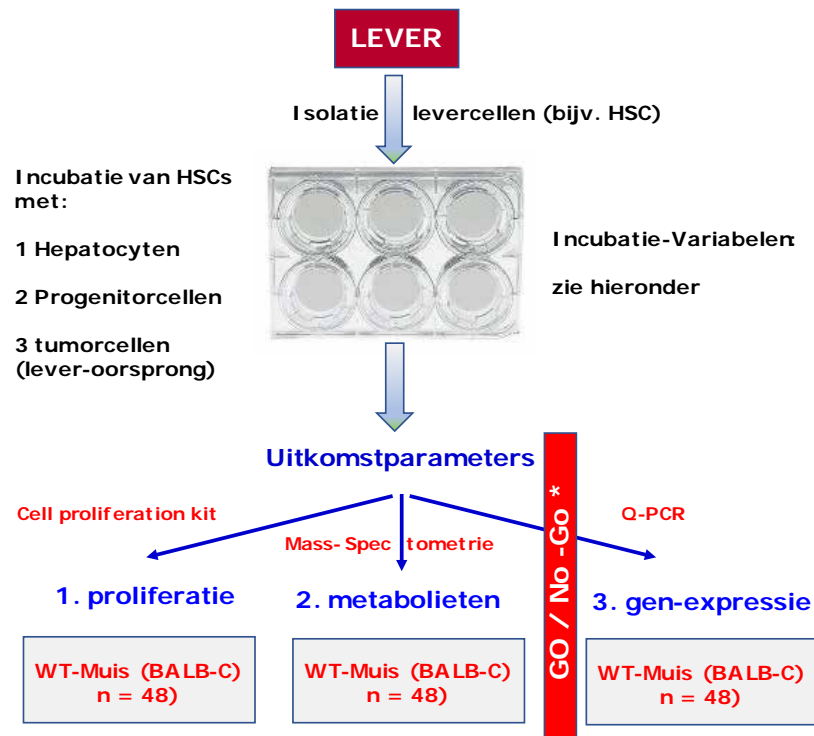
3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

Doelstelling 1: De mechanismen van activatie van HSCs. Op dit moment wordt er een methode ontwikkeld om rustende HSCs gedurende een langere periode te kweken onder omstandigheden waarbij ze het rustende

fenotype behouden. Hierdoor zal het voor het eerst mogelijk zijn om niet alleen de verschillen tussen de rustende en geactiveerde HSCs in kaart te brengen, maar ook om te screenen voor activerende en remmende moleculen die een interactie aangaan met eiwitten die een rol spelen tijdens het HSC activatieproces. Door gebruik te maken van LRAT-KO-muizen kan ook de rol van de LRAT-gesynthetiseerde retinylester-voorraad worden onderzocht.



Doelstelling 2: Communicatie van HSCs met andere levercellen. Tijdens het activatie proces van HSCs wordt vitamine A en/of metabolieten daarvan zoals retinoïnezuur uitgescheiden. Tevens worden tijdelijk meervoudig onverzadigde vetzuren juist ingebouwd in de lipiden van HSCs. Vitamine A is een belangrijk signaal molecuul dat zowel autocrien (interactie met de cel die het uitgescheiden heeft) als paracrien (interactie met andere cellen) kan werken. De interactie met andere cellen die betrokken zijn bij het ontstaan van leverschade en leverregeneratie (bijvoorbeeld immuun cellen en stamcellen) en de rol van vitamine A derivaten zullen bestudeerd worden. Meervoudig onverzadigde vetzuren kunnen zowel een ontstekingsremmend (w-3 vetzuren) als ontstekingsbevorderende (w-6 vetzuren) werking hebben en de rol van inbouw van meervoudig onverzadigde vetzuren in HSCs op leverontsteking en leverregeneratie zal onderzocht worden.



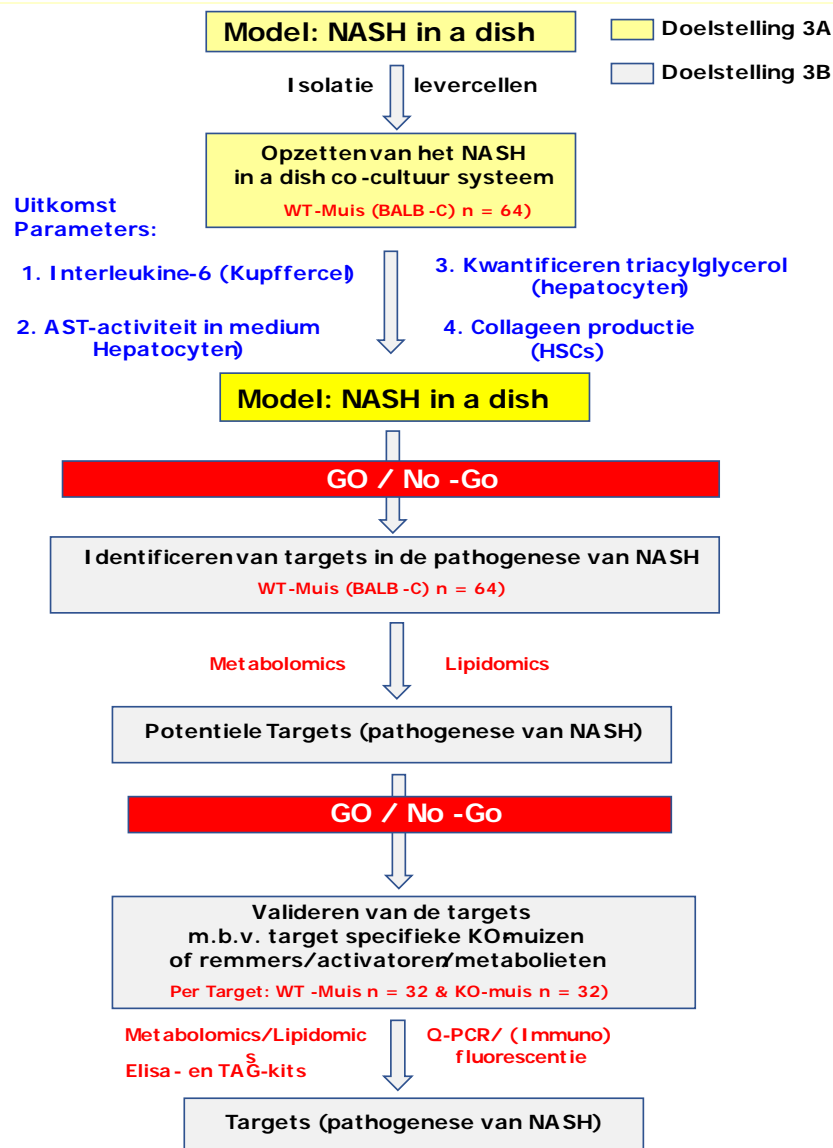
Variabelen:

1. Rustende (veel retinylesters) vs. geactiveerde (weinig retinylesters en veel meervoudig onverzadigde vetzuren) HSCs.
2. Incubaties in af- of aanwezigheid van ECM/Matrigel
3. Supplementatie medium met vitamin-A en/of meervoudig onverzadigde vetzuren.

*Go / NO GO-moment; Als geen effecten worden gemeten in de experimenten van uitkomstparameters 1 of 2 is dit een No-Go.

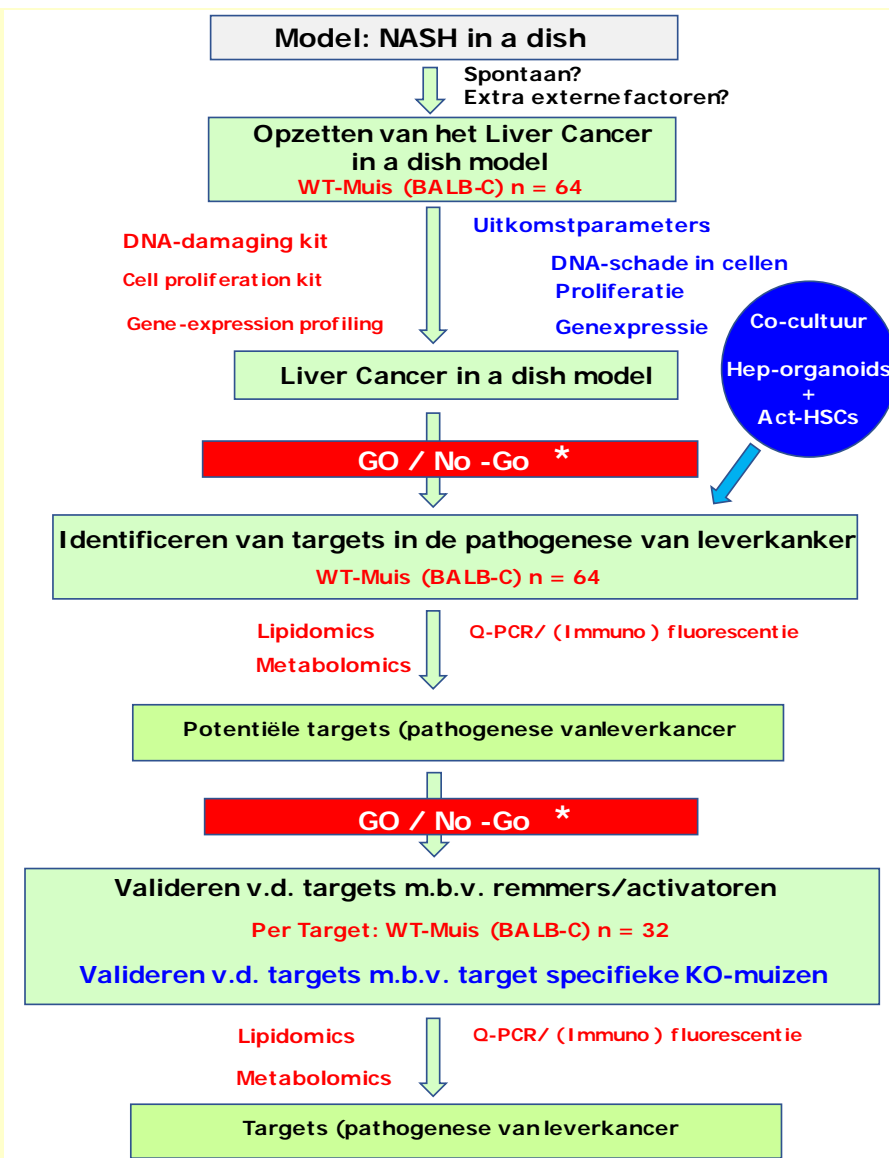
Figuur-2 Strategie en GO / No-Go moment doelstelling-2

Doelstelling 3: Het optimaliseren van een in vitro lever co-kweek systeem bestaande uit hepatocyt-organoiden, Kupffer cellen en HSCs. Essentieel is het ontwikkelen van een chemisch gedefinieerd en serumvrij co-cultuur medium waarin het fenotype van de verschillende aanwezige celtypen stabiel is. Vervolgens kan hiermee een NASH model ontwikkeld worden (NASH-in-a-dish) door toevoeging van verschillende lipiden, sterolen, en suikers. Dit is een voorwaarde voor het verder uitwerken en karakteriseren van beschreven in vivo NASH fenotypes zoals lipide-stapeling in hepatocyten (en hepatocyten "ballooning"), secretie van inflammatoire cytokines (Kupffer cellen) en collageen secretie (door HSCs) (Bedossa et al., 2014). Metabolomic analyses, van de verschillende celtypen zal gebruikt worden voor het identificeren en valideren van targets die een rol spelen bij het ontwikkelen van NASH (zie figuur grijze rechthoeken). Dit kan mogelijk leiden tot nieuwe behandelingsmethoden om NASH te voorkomen of te behandelen.



Figuur-3 Strategie en Go / No-Go-momenten van doelstelling-3

Doelstelling 4: De interactie van HSCs met hepatocyten in leverkanker. De ontstekingsreactie in de lever die leidt tot NASH en oxidatieve stress verhogen de kans op het ontstaan van leverkanker. Deze processen zullen in het NASH-in-a-dish onderzocht worden door te kijken naar kanker gerelateerde fenotypes zoals het ontstaan van DNA-schade in de betrokken cellen en naar celdeling (Figuur 4, flow van boven naar beneden) . Het ontstaan van leverkanker wordt tevens onderzocht in co-cultuur systemen (spheroids) van hepatocyten (hepatocyt-organoids) en geactiveerde HSCs, naar analogie van de cancer-associated fibroblasts (CAFs), die in vivo in de micro-omgeving van levertumoren worden gevonden (Figuur-4, beginnend vanaf donker-blauwe cirkel het co-cultuur systeem). In beide co-kweek systemen zullen de metabole interacties die ten grondslag liggen aan de cel-cel interacties onderzocht worden en zullen de gevonden resultaten geverifieerd worden door gebruik te maken van remmers en activators van de betrokken metabole paden en in muis modellen waarin het betrokken gen uitgeschakeld/veranderd is.



Figuur-4 Strategie en Go / No -Go-momenten van doelstelling-4

De overkoepelende doelstelling van het voorgestelde onderzoek is het identificeren van zgn. key-nodes, cruciale enzymen of biochemische paden, die betrokken zijn bij het ontstaan van leverschade (NASH) en leverkanker.

De reden voor focus op keynodes is omdat het effect van inhibitoren in deze keynodes op cellulaire processen het grootst zal zijn en secundaire effecten zoveel mogelijk vermeden worden. Het accent ligt daarbij op key-nodes in hepatische stercellaten (doelstelling 1-4), maar mogelijk worden ook key-nodes in hepatocyten en/of macrofagen gevonden (doelstelling 2-4). Zoals aangegeven in de aanvraag hopen we een beperkt aantal keynodes (4 in doelstelling 1 en x in doelstelling 3b) te kunnen valideren door bestudering van de cellulaire response met behulp van inhibitoren.

Referentie:

Bedossa P, and the FLIP Pathology Consortium. Utility and Appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014, (60) 565-575

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Het project bestaat uit nauw verwante deelprojecten, die allen tot doel hebben meer inzicht te krijgen in de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan van leverontsteking en leverkanker. De deelprojecten kunnen gedeeltelijk parallel aan elkaar uitgevoerd worden omdat ze onafhankelijk van elkaar uitgevoerd kunnen worden en omdat een aantal deelprojecten ook niet afhankelijk zijn van de resultaten van andere deelprojecten. De deelprojecten maken wel veelvuldig gebruik van dezelfde celtypen, zodat er een efficiënt en optimaal gebruik van dierlijk materiaal gewaarborgd wordt en vermindert dit het noodzakelijke aantal proefdieren.

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

Volgnummer Titel bijlage Beschrijving dierproef

1	Isolatie primaire levercellen uit wildtype en genetisch gemodificeerde muizen
2	Click or tap here to enter text.
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.



Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl
- 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 het volgnummer en de titel van de dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.</i>	Volgnummer	Titel dierproef
	1	Isolatie primaire levercellen uit wildtype en genetisch gemodificeerde muizen

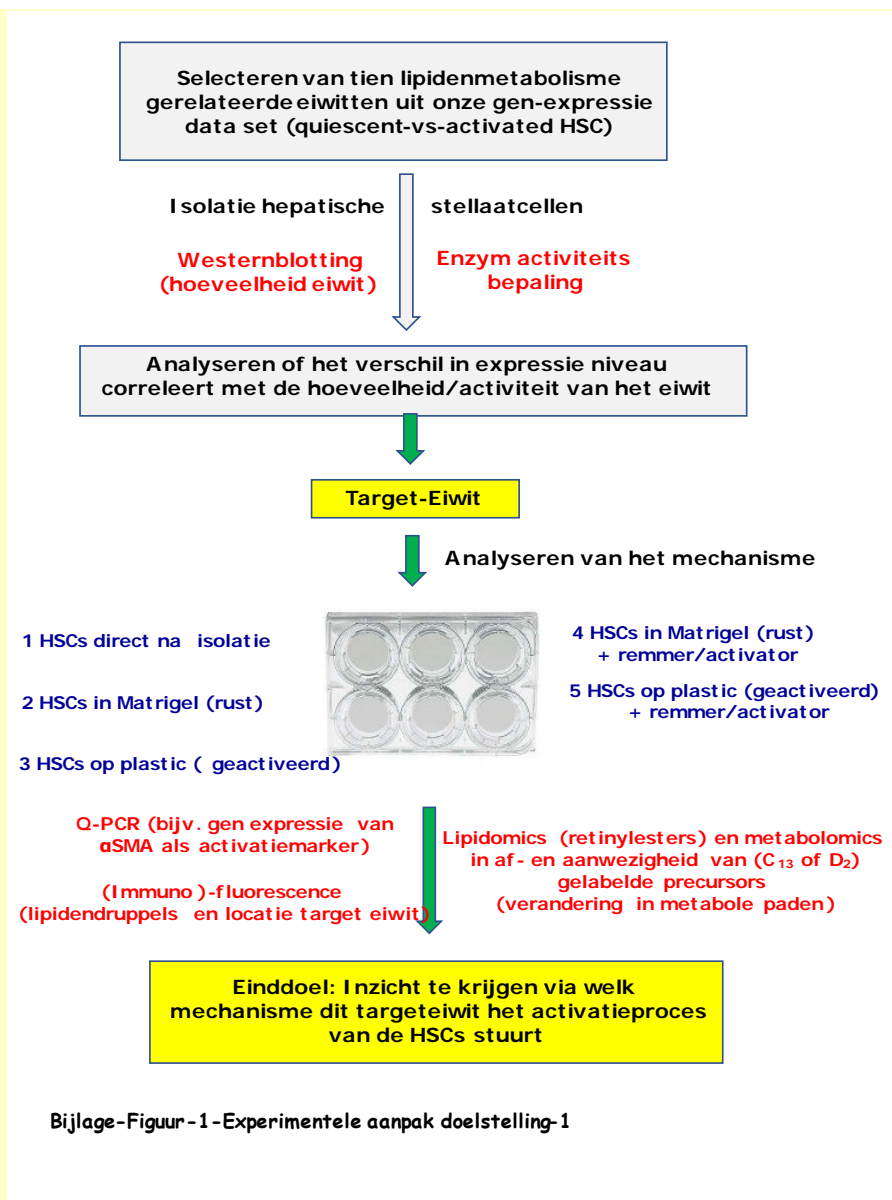
2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

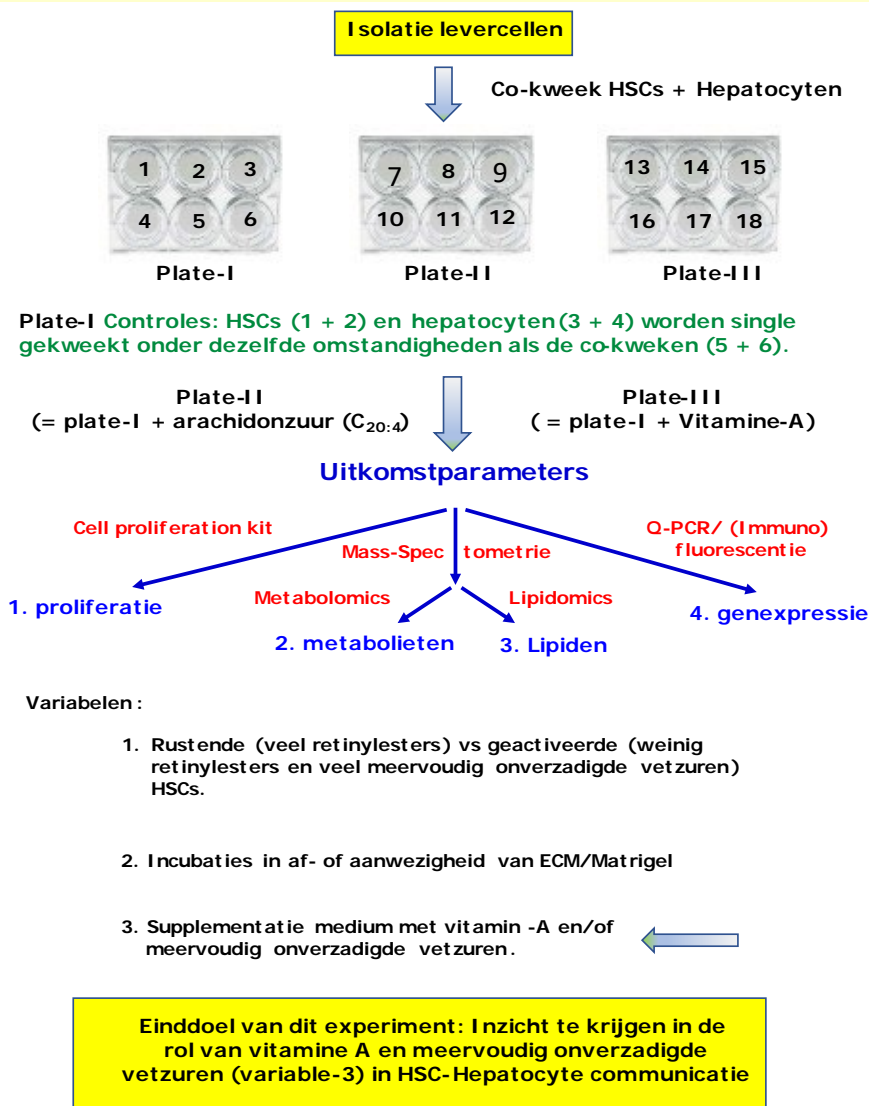
Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Het gebruik van primaire hepatische stellaatcellen (HSCs) staat centraal in alle vier de in dit projectvoorstel beschreven doelstellingen. De metamorfose van een "rustende" (quiescent) stellaatcel naar zijn geactiveerde fenotype speelt een belangrijke rol in het ontstaan van zowel NASH (doelstelling-3) als leverkanker (doelstelling-4). Onderzoeksdoelstelling-1 en -2 bestuderen respectievelijk, het mechanisme van deze activatie en hoe de communicatie tussen de stellaatcellen en andere levercellen tijdens dit activatie proces verloopt.

Doelstelling-1: De mechanismen van activatie van HSCs. Er is consensus in de literatuur dat de activering van HSCs een centrale rol speelt in de pathogenese van vele leverziekten (bijv. NASH en leverkanker). Inzicht in het mechanisme van activatie kan leiden tot het voorkomen of betere behandelingsmethoden van leverziekten. Deze experimenten zijn een uitbreiding/continuering van het CCD-project met het nummer: AVD1080020174484. Na selectie van 10 lipidenmetabolisme gerelateerde eiwitten/enzymen uit onze gen-expressie data set zullen we analyseren of de gemeten veranderingen op gen niveau correleren met de eiwit hoeveelheid of enzyme activiteit (zie figuur-1). Vervolgens zullen targeteiwitten worden bestudeerd om inzicht te krijgen via welk mechanisme ze het activatie proces van HSCs sturen (zie figuur-1 voor experimentele details). De primaire uitkomstparameters zijn lipidomic analyses (bijv. retinyl ester bepaling) in af- en aanwezigheid van deuterium gelabelde precursors, qPCR en immunofluorescentie (zie ook figuur-1).

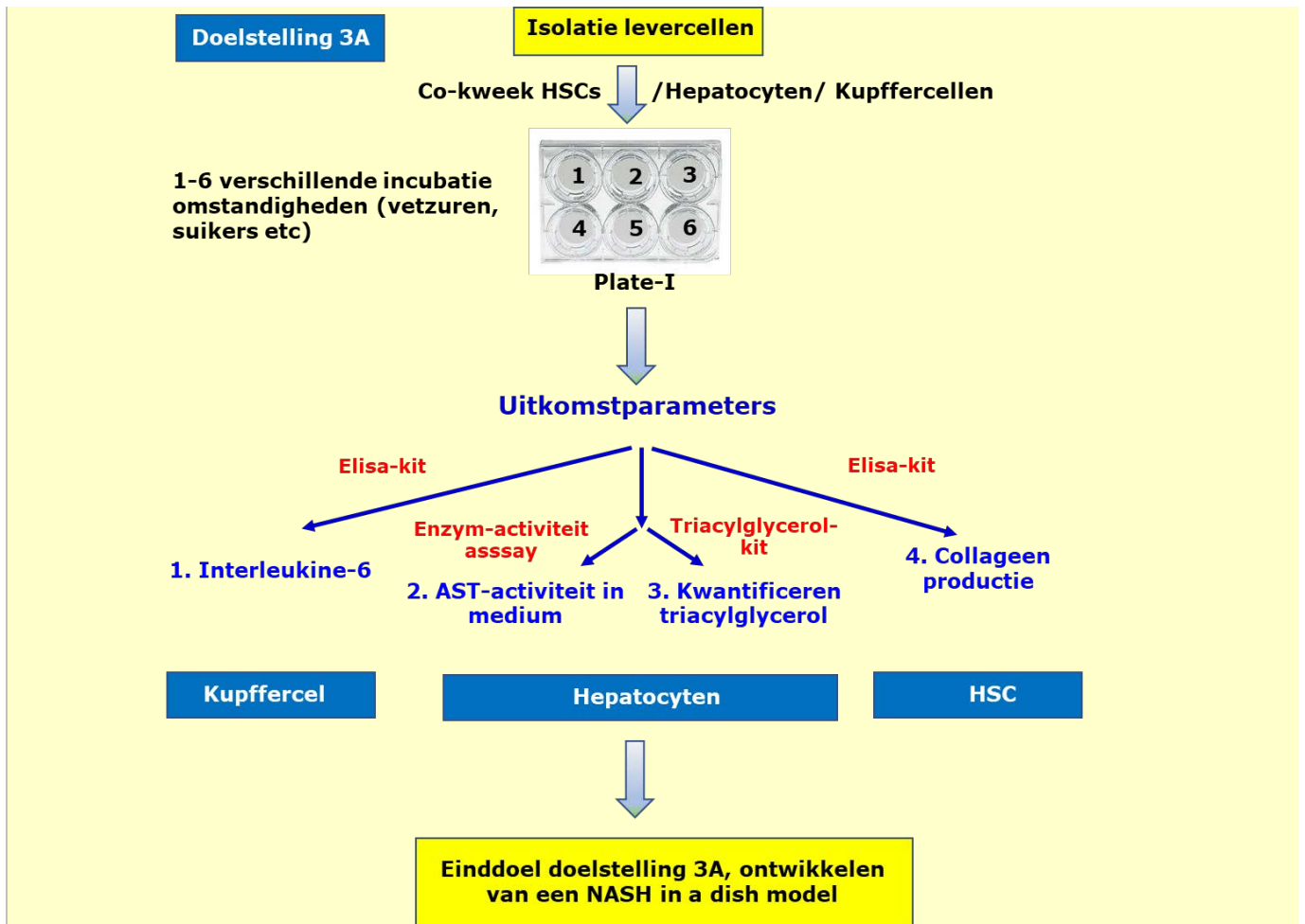


Doelstelling 2: Communicatie van HSCs met andere levercellen. Interactie tussen HSCs en hepatocyten (inclusief stercelcellen en tumorcellen met een hepatocyte oorsprong) wordt onderzocht door te kijken naar effecten van co-kweek onder verschillende kweek-omstandigheden, inclusief 2D co-kweek en/of 3D spheroids, in beide gevallen met en zonder de aanwezigheid van een ECM-component (Matrigel). De primaire uitkomstparameters zijn proliferatie, metabole paden (bijv. glycolyse, Krebscyclus en nucleotiden & glutathion synthese) (metabolomics en lipidomics) en genexpressie in de verschillende celtypen. Voor de karakterisering van de HSCs en het bepalen van hun activatie-status worden tevens qPCR en immunofluorescentie bepalingen uitgevoerd. In figuur-2 is een experimentele set-up weergegeven.



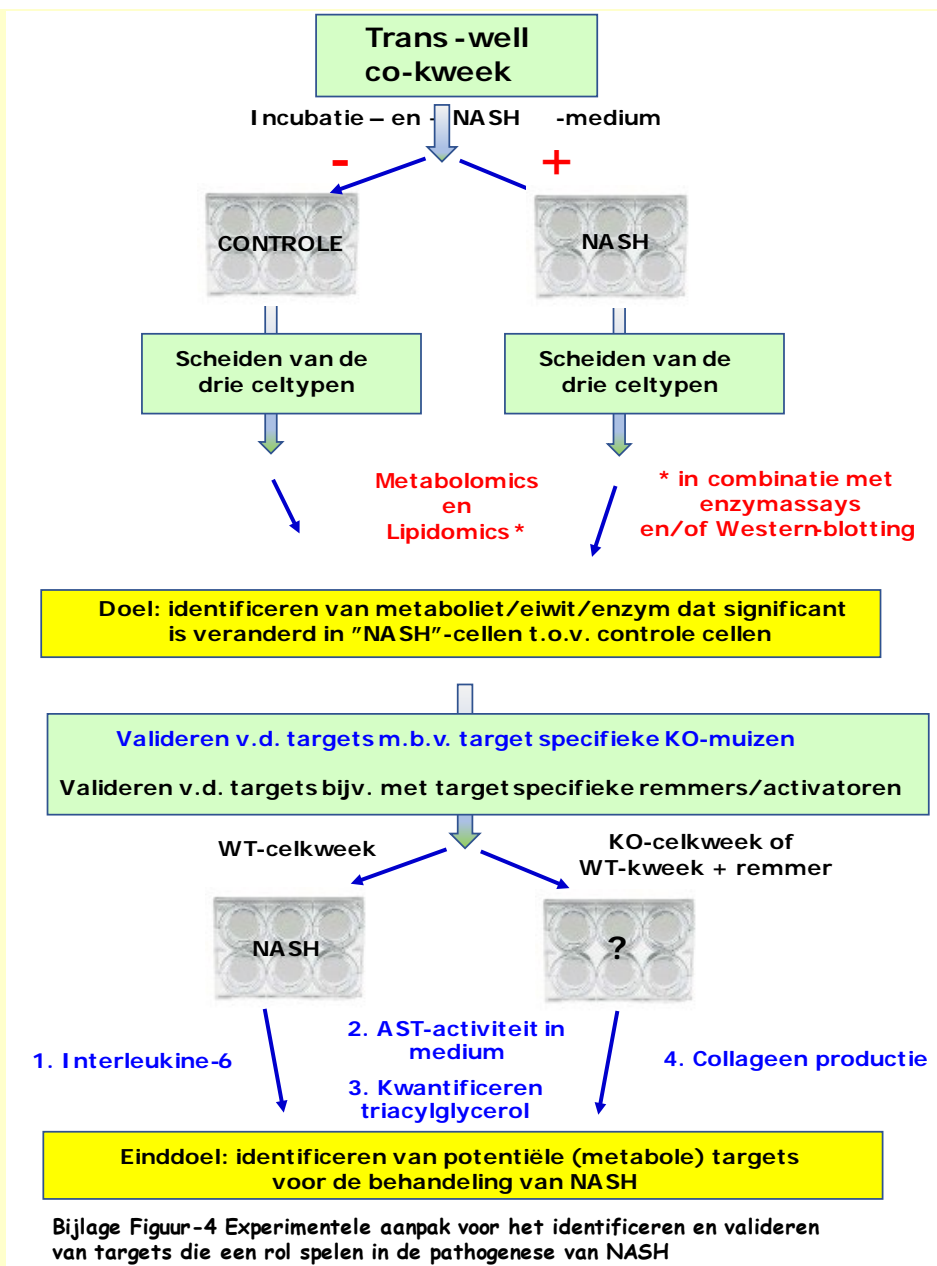
Bijlage Figuur-2 Voorbeeld van een experimentele set-up.

Doelstelling 3: Ontwikkeling van een Transwell co-kweek systeem voor NASH (3A) en het identificeren en onderzoeken van targets in metabole paden welke betrokken zijn bij de ontwikkeling van NASH (3B). In Figuur 3 zijn, i) de experimentele aanpak en ii) de aan NASH gerelateerde uitkomstparameters en hun bepalingsmethodes weergegeven (doelstelling 3A).



Bijlage Figuur-3 Experimentele aanpak opzetten NASH in a dish model

In Figuur 4 is de experimentele aanpak weergegeven voor doelstelling 3B. Metabole paden die veranderen tijdens het induceren van NASH en de daar uit voortvloeiende targets zijn onbekend.



Doelstelling 4: De interactie van HSCs met hepatocyten in leverkanker. Het Transwell co-kweek systeem zal worden gebruikt om de ontwikkeling van leverkanker in hepatocyten te bestuderen na inductie van NASH. Daarnaast zal ook het co-cultuur systeem (hepatische organoids plus geactiveerde HSCs) gebruikt worden om inzicht te krijgen in metabole veranderingen die bijdrage aan een verhoogd risico op leverkanker bij NASH patiënten. Onze hypothese is dat "metabolic reprogramming" (bijv. veranderingen in glycolyse, glutaminolyse en lipidometabolisme) hierin een belangrijke rol spelen. De primaire uitkomstparameters zijn proliferatie, metabolisme (metabolomics en lipidomics) en genexpressie-profilering in de verschillende celtypen. Voor de karakterisering van de HSCs en het bepalen van hun activatie-status worden tevens qPCR en immunofluorescentie bepalingen uitgevoerd.

Bij alle doelstellingen is gekozen voor een *in vitro* experimentele aanpak, omdat i) bij doelstellingen 3 en 4 muizen niet blootgesteld worden aan (hoog) ongerief door het induceren van NASH en/of leverkanker en ii) in geïsoleerde stellaatcelculturen meerdere agonisten/remmers van metabole paden getest kunnen worden tijdens één experiment (zie bijv. bijlage figuur 1 en 2).

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.

Voor de isolatie van hepatische stellaat cellen worden de muizen 1 maal onder narcose gebracht om de buikholte te openen en de lever te perfunderen. Tijdens de perfusie (na ongeveer 1 minuut) sterven de dieren onder narcose door verbloeding. Alle experimenten met de levercellen gebeuren tijdens het kweken van de levercellen in het laboratorium en niet in de dieren zelf.

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

Doelstelling 1: De mechanismen van activatie van HSCs. Hierbij worden veranderingen gemeten tussen quiescent (dag 0/ dag 1 of Matrigel kweek) en geactiveerde (dag 7 of dag 14 plastic kweek) HSCs. De primaire uitkomstparameters zijn lipidomic analyses (bijv. retinyl ester bepaling), qPCR en immunofluorescentie Met inhibitors, lecithin-retinol acyltransferase knock-out muizen (LRAT-KO) en deuterium gelabelde lipiden via lipidomics analyse (vierde uitkomstparameter) wordt gekeken naar hoe die veranderingen in HSCs tot stand komen. Uit ervaring weten we dat per experiment twee uitkomstparameters gecombineerd kunnen worden, waardoor het aantal aangevraagde muizen met twee wordt vermenigvuldigd om alle uitkomstparameters per target te meten (zie hieronder).

Voor het selecteren van vier targets vanuit onze genexpressie dataset schatten we **20 muizen** nodig te hebben (zie figuur-1 projectvoorstel).

Een standaard experiment bestaat uit de volgende samples: 1) cellen direct na isolatie, 2) cellen quiescent in kweek (Matrigel) en 3) cellen geactiveerd in kweek (plastic-schaaltjes), en deze laatste twee elk met en zonder inhibitor(s), eventueel in combinatie met een deuterium label om de metabole veranderingen te kunnen detecteren. We zoeken naar targets om activatie van HSCs te verminderen, dus vergelijken we de geactiveerde cellen met en zonder inhibitor met een gepaarde t-test.

Uit eigen data blijkt: SD van de lipide bepaling en van de genexpressie van alfa-SMA in hepatische stellaatcellen is 35% van het gemiddelde. Het kleinste verschil tussen de cellen onderworpen aan de verschillende behandelingen wordt verwacht 50% te zijn. Bij een power van 80% is $N = 5$. Voor 1 experiment worden cellen uit 4 muizen geïsoleerd om voldoende materiaal te hebben. M.a.w., 4 muizen per experiment en bij $N=5$ is dit 20 muizen per target. In eerdere studies hebben we twee targets geïdentificeerd en onderzocht. De verwachting is dat er nog 4 targets getest gaan worden. Dat komt neer op $4 \text{ (targets)} * 20 \text{ (muizen per target)} * 2 \text{ (uitkomstparameter)} = \mathbf{160 \text{ muizen}}$.

Om te bepalen welke effecten op retinyl ester samenstelling worden gemedieerd via LRAT zal naar verwachting bij 2 van de 4 targets een vergelijking met LRAT-knock-out muizen gemaakt worden (welke nauwelijks retinyl ester opslag hebben). Hiervoor zijn $2 \text{ (targets)} * 20 \text{ (muizen per target)} * 2 \text{ (uitkomstparameters)} = \mathbf{80 \text{ LRAT-knock-out muizen}} \text{ nodig}$.

Doelstelling 2: Communicatie van HSCs met andere levercellen. Interactie tussen HSCs en hepatocyten (inclusief stamcellen en tumorcellen met een hepatocyte oorsprong) wordt onderzocht door te kijken naar effecten van co-kweek onder verschillende kweek-omstandigheden, inclusief 2D co-kweek en/of 3D sferoids, in beide gevallen met en zonder de aanwezigheid van een ECM-component (Matrigel). De primaire uitkomstparameters zijn proliferatie, metabolisme (metabolomics en lipidomics) en genexpressie in de verschillende celtypen. Voor de karakterisering van de HSCs en het bepalen van hun activatie-status worden tevens qPCR en immunofluorescentie bepalingen uitgevoerd.

De verwachte effecten op proliferatie zijn minimaal 50%. De verwachte SD is 30%. Bij een gepaarde vergelijking van losse en co-kweek vraagt dit om een sample grootte van 4. Voor 1 experiment worden cellen uit 4 muizen geïsoleerd om voldoende materiaal te hebben. Dus per cel type waarmee de HSC ge-co-kweekt wordt: $4 * 4 * 3 \text{ (uitkomstparameters)} = 48 \text{ muizen}$. Bij het co-kweken van HSCs met drie verschillende celtypen (hepatocyten, stamcellen en tumorcellen van lever origine) komt dat neer op in totaal $48 * 3 = \mathbf{144 \text{ muizen}}$.

Doelstelling 3: Ontwikkeling van een Transwell co-kweek systeem voor NASH en het identificeren en onderzoeken van targets in metabole paden.

A] ontwikkelen NASH in a dish model: De levercellen die betrokken zijn bij het ontstaan van NASH worden in een *in vitro* Transwell co-kweek systeem onder verschillende omstandigheden gekweekt met als doel een stabiel kweekstelsel te creëren waarbij alle celtypen hun fenotype gedurende langere tijd (weken) behouden. Vervolgens wordt NASH geïnduceerd door vetzuren, al dan niet in combinatie met cholesterol en/of suikers, aan het medium toe te voegen.

In een standaard experiment worden de verschillende type levercellen direct na isolatie overgebracht in het Transwell co-kweek systeem, waarbij verschillende concentraties van cellen, samenstelling van het medium en de aanwezigheid van een ECM-component zoals Matrigel onderzocht worden met als doel het co-kweek systeem zo lang mogelijk stabiel te houden. Vervolgens kunnen verschillende combinaties van vetzuren, cholesterol en suikers toegevoegd worden om NASH te induceren.

De primaire uitkomstparameters zijn: 1) hepatocyten, aspartate aminotransferase (AST) in het medium (hepatocyte-schade) en de hoeveelheid triacylglycerol (vetophoping), 2) Kupffercellen, interleukine-6 (ontstekingsmarker) en 3) HSC, collageen productie als maat voor de vorming van de ECM. Uit de literatuur is bekend in welk medium de verschillende leverceltypen (HSC, hepatocyten en Kupffer cellen) het best gedijen. De uitdaging zal echter zijn om een medium en omstandigheden te vinden waarin alle drie de celtypen hun fenotype behouden en om vervolgens de optimale conditie (verhouding vetzuren, suikers en cholesterol) te vinden om NASH te induceren.

Voor één experiment worden cellen uit vier muizen geïsoleerd om voldoende materiaal te hebben. We schatten dat 16 experimenten nodig zijn om het **NASH model te ontwikkelen**. Totaal $4 * 16$ is **64 BALB/c muizen**. Er wordt gekozen voor BALB-C muizen omdat deze muizen de hoogste hoeveelheid "zuivere" stellaatcellen opleveren.

Het opzetten van het NASH-model systeem is één van de Go /No-Go momenten in onze aanvraag (zie project-aanvraag formulier figuur-3). De experimenten beschreven in het tweede deel (B) van doelstelling 3 en in doelstelling 4 (het deel gerelateerd aan het NASH in a dish model) kunnen en zullen dus alleen uitgevoerd worden als doelstelling 3 onderdeel A is behaald. Het NASH-model is succesvol opgezet als de beschreven primaire uitkomstparameters in alle drie celtypen het NASH-fenotype vertonen.

B] Identificeren en onderzoeken van metabole targets die een rol spelen in de pathogenese van NASH. Het ontwikkelde NASH in a dish model zal gebruikt worden om metabole targets te identificeren die een rol spelen in de pathogenese van NASH, en de rol van deze targets zal vervolgens verder onderzocht worden in cellen geïsoleerd uit KO-muizen (target specifieke knock-outs). Optioneel: target specifieke remmers of metaboliet toevoegen aan het medium. Dit is een tweede Go/No-Go moment, omdat alleen experimenten met KO-muizen (of target specifieke remmers) uitgevoerd zullen worden als er targets geïdentificeerd zijn. Optioneel als de target specifieke KO-muis niet beschikbaar is zal het gebruik van een target specifieke remmer geëvalueerd worden.

De primaire uitkomstparameters zijn metabolisme (metabolomics en lipidomics) en genexpressie in de verschillende celtypen. Tevens zullen qPCR en (immuno-)fluorescentie bepalingen worden uitgevoerd.

In een standaard experiment worden de verschillende type levercellen direct na isolatie overgebracht in het Transwell co-kweek systeem en de verschillende uitkomstparameters in controle kweken vergeleken met die in NASH-geïnduceerde kweken. Als uit de analyse van de data blijkt dat bepaalde metabole biochemische processen betrokken zijn bij het ontstaan van NASH, dan zullen levercellen uit bestaande genetisch gemodificeerde muizen (beschikbaar via andere onderzoeksgroepen of commercieel verkrijgbaar) worden geïsoleerd en getest worden in het Transwell co-kweek systeem. Het is niet voorzien dat genetisch gemodificeerde muizen zelf ontwikkeld zullen worden.

Voor deze experimenten is een tijdspad voorzien, waarbij gedurende de looptijd van het hele project (minus het start jaar wat is in geruimd voor het ontwikkelen van het NASH-model, doelstelling 3A) **320 muizen** gebruikt zullen worden (4 (muizen per experiment) $* 20$ weken (1 experiment per twee weken) $* 4$ (aantal jaar)).

Doelstelling 4: De interactie van HSCs met hepatocyten in leverkanker. Het Transwell co-kweek systeem zal worden gebruikt om de ontwikkeling van leverkanker in hepatocyten te bestuderen na inductie van NASH in het co-kweek systeem. De primaire uitkomstparameters zijn proliferatie, metabolisme (metabolomics en lipidomics) en genexpressie-profilering in de verschillende celtypen. Voor de karakterisering van de HSCs en het bepalen van hun activatie-status worden tevens qPCR en immunofluorescentie bepalingen uitgevoerd.

De resultaten zullen worden vergeleken met een gepubliceerd HCC model sferoid systeem dat bestaat uit LGR+ HCC-organoids en primaire hepatische stellaatcellen, geïsoleerd uit genetisch-gemodificeerde muizen die roodgekleurde stellaatcellen bevatten. In beide co-kweek systemen (Transwell en sferoids) zal de rol van de stellaat cel onderzocht worden door zowel geactiveerde als rustende stellaat cellen (bijv in combinatie met ECM) toe te voegen. De primaire uitkomstparameters van het sferoid systeem zijn proliferatie, genexpressie qPCR en immunofluorescentie bepalingen in de verschillende celtypen na scheiding van de celtypen op basis van hun kleur door middel van FACS.

Voor deze experimenten is een tijdspad voorzien, waarbij gedurende de looptijd van het hele project (minus het start jaar wat is in geruimd voor het ontwikkelen van het NASH-model, doelstelling 3A) **320 muizen** gebruikt zullen worden (4 (muizen per experiment) * 20 (40 weken per jaar en 1 experiment per 2 weken) * 4 (aantal jaar)).

B. De dieren

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

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	muis	dieren aangekocht (Janvier Labs) of gefokt voor onderzoek	Volwassen (leeftijd 3-6 maanden)	1108	mannelijke en vrouwelijke	wildtype en genetisch gewijzigde dieren	C57BL/6J en BALB/c

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Muis (<i>mus musculus</i>). Van de muis zijn vele genetisch gemodificeerde varianten beschikbaar zodat we voor de validatie van de experimenten deze varianten niet zelf hoeven te genereren.
Herkomst	Dieren aangekocht (Janvier labs Frankrijk) of gefokt voor onderzoek. Doordat de muizen onder standaard omstandigheden gefokt worden, worden belangrijke parameters gecontroleerd (leeftijd, voeding, infecties) zodat deze de experimentele uitkomst niet beïnvloeden en er minder dieren nodig zijn voor het bepalen statistisch-relevante verschillen tussen verschillende condities
Levensstadia	Volwassen dieren (ongeveer 5-6 maanden oud). Met name het aantal hepatische stellaat cellen neemt toe tijdens de ontwikkeling tot volwassenen muizen. Voor een optimale opbrengst aan hepatische stellaat cellen is het daarom van belang te wachten tot de dieren volwassen zijn om zodoende het aantal benodigde dieren te minimaliseren.
Aantal	1108: op basis van doelstelling 1-4, het gebruik van wildtype en genetisch gemodificeerde muizen, is dit aantal berekend met in achtname van de te verwachte verschillen. Voor doelstelling 1 en 2 is een poweranalyse beschreven voor het aantal te bestuderen condities. Voor de projecten 3 en 4 is een lange termijn doelstellingen beschreven waarbij het aantal metabole wegen onbekend is, maar waarbij de tijdsfactor van de project aanvraag limiterend is (5 jaar).
Geslacht	Centraal in dit onderzoek staat het analyseren van metabole interacties tussen verschillende levercellen. Omdat het metabolisme tussen mannelijke en vrouwelijke dieren verschilt, zullen standaard beide geslachten onderzocht worden.

Genetisch gewijzigd	- LRAT KO muizen. Deze muis wordt ingezet voor doelstelling 1, omdat bekend is dat de retinoiden pool in de stellaatcellen verdwijnt tijdens het activeringsproces. 1. Voor doelstelling 3 en 4 zal na identificatie van een target eiwit/enzym de target specifieke KO-muis gebruikt worden om de rol van het betreffende eiwit/enzym in de ontwikkeling van NASH te valideren.
Stam	C57BL/6J en BALB/c. Genetisch gewijzigde dieren, die beschikbaar zijn via andere onderzoeksgroepen of commercieel verkrijgbaar, hebben veelal een C57BL/6J of een BALB/c achtergrond. Voor de analyse zullen deze muizen vergeleken worden met wildtype muizen die respectievelijk een C57BL/6J of BALB/c achtergrond hebben.

C. Huisvesting en verzorging

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

Já

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

De muizen worden gehuisvest en verzorgd in het Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium, een facilitair instituut van de Universiteit Utrecht, en in het Animal Research Center (Utrecht Science Park Bilthoven). Op de dag van het experiment worden de muizen naar het laboratorium overgebracht.

D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

n.v.t.

E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.

F. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief wordt geclassificeerd als 'terminaal': de muizen worden onder anesthesie gebracht en na perfusie van de lever sterven de dieren onder narcose door verbloeding.

G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	Vervanging is momenteel nog niet mogelijk maar we volgen de ontwikkelingen op de voet (bijv. gebruik van humane stellaatcellen gegenereerd uit "human pluripotent stem cells" voor doelstelling twee). Vervanging is (nog) niet mogelijk omdat voor het onderzoek het essentieel is om vers geïsoleerde, primaire hepatische stellaatcellen (rustende fenotype) en geactiveerde HSCs (geactiveerde fenotype) naast elkaar te kunnen bestuderen. Het onderzoek wordt verricht aan HSCs geïsoleerd uit muizen, omdat voor drie van de vier in dit project beschreven doelstellingen genetisch gemodificeerde muizen zullen worden gebruikt. Het vers isoleren uit muizen levers is noodzakelijk omdat, i) er momenteel geen goede methode beschikbaar is om primaire HSCs te isoleren uit stukjes lever (meeliften met andere studies kan helaas (nog) niet (zie eerdere opmerking isolatie-kit we gaan het) en ii) alle beschikbare cellijnen die op dit moment verkrijgbaar zijn, hebben een geactiveerd fenotype.
Vermindering	De experimenten worden uitgevoerd in de kleinst mogelijke co-kweek systemen, waarbij net voldoende cellen/celtypen aanwezig zijn voor de metabolomics/lipidomics analyse met behulp van de meest geavanceerde massaspectrometrie apparatuur (in house apparatuur en faciliteit) en waarbij tevens statistisch significante verschillen kunnen worden vastgesteld.
Verfijning	We zullen in dit project een NASH- en leverkanker-model in a dish opzetten. Daar zijn proefdieren voor noodzakelijk. Het betekent echter wel, dat we de pathogenese van NASH en leverkanker kunnen onderzoeken zonder dat proefdieren blootgesteld worden aan een hoger mate van ongerief (induceren van NASH of leverkanker in vivo).

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

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

[Click or tap here to enter text.](#)

H. Hergebruik

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

Nee > ga verder met vraag I.

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

[Click or tap here to enter text.](#)

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

Nee

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

[Click or tap here to enter text.](#)

I. Herhaling

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

n.v.t.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.

3 Einde Experiment

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Click or tap here to enter text.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

De muizen zijn niet levensvatbaar na perfusie van de lever

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

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Click or tap here to enter text.

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

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Click or tap here to enter text.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

De dieren worden onder diepe anesthesie gebracht met behulp van isofluraan. Openen van de buikholte en inbrengen van de canule gebeurt onder isofluraan narcose en de dieren overlijden door verbloeding onder narcose. Voor de isolatie van functionele hepatische stellaatcellen moet de perfusie gedaan worden op in leven zijnde dieren en daarom is voor deze minst ongerief opleverende procedure gekozen. Zie Mederacke et al (2015) Nature Protocols (<https://doi.org/10.1038/nprot.2015.017>) voor gedetailleerde informatie).

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

Click or tap here to enter text.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD10800202317226
2. Titel van het project : Identificeren van nieuwe mogelijkheden voor de behandeling van leverontsteking en van leverkanker
3. Titel van de NTS : Identificeren van nieuwe mogelijkheden voor de behandeling van leverontsteking en van leverkanker

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 14-07-2023
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 19-07-2023
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 24-07-2023 / 27-10-2023
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 04-12-2023

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 19-07-2023
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 4
- Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over de strategie, de transgene muizen en de parameters. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 24-07-2023

- Datum antwoord: 27-10-2023
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:
- *Projectvoorstel*

3.1 Achtergrond

Fundamentele vraag: voor de ethische afweging door de DEC is het essentieel dat in de inleiding van de aanvraag duidelijk is waarom het gebruik van 1108 muizen als proefdieren noodzakelijk is voor dit onderzoek, terwijl er (inter)nationaal al veel onderzoek op dit gebied wordt verricht. M.a.w. de DEC mist nu de wetenschappelijke inbedding: Wat gebeurt er bijvoorbeeld in de kliniek en in andere groepen - lokaal en (inter)nationaal - op het gebied van onderzoek naar oorzaken en mogelijkheden voor behandeling (mechanistische aspecten, hypothesen pathofysiologie bij het ontstaan van NASH) van deze en verwante leveraandoeningen? Kunt u dit toevoegen?

Het klopt dat er internationaal veel onderzoek op dit gebied wordt gedaan. Echter, het onderzoek naar de rol van de hepatische stercel in het ontstaan van NASH is zeer beperkt (zie onderstaande tabel).

Tabel: PUBMED search naar het aantal publicaties van de afgelopen 10 jaar in hepatische stercel / NASH onderzoeksveld

Search term (All Fields)	Number of Hits in last 10 year		
	Total	Research Article	Review
NASH	35,563	29,020	6543
HSC AND NASH	274	226	48
HSC AND NASH AND Lipids	79	65	14
HSC AND NASH AND Lipidomics	1	1	0
HSC AND NASH AND Metabolomics	7	7	0

De belangen zijn immens omdat zo'n groot deel van de totale bevolking 'at risk' is en er een grote toename van ziektes in de nabije toekomst wordt verwacht. Vanwege deze grote doelgroep is tevens medicijn-ontwikkeling door de farmaceutische industrie aantrekkelijk. Ondanks al dit onderzoek is er nog geen enkel goedgekeurd medicijn voor de behandeling van NAFLD/NASH. Wel zijn er medicijnen in de pijplijn (clinical trials, zie bijlage 1), maar het moet nog maar blijken of die daadwerkelijk geschikt blijken. Tot op heden ligt de nadruk op veranderingen van life style, om NAFLD te voorkomen of te bestrijden.

Onze groep levert een unieke bijdrage aan dit onderzoek door de focus op de bestudering van lipid en metaboliet metabolisme tijdens NAFLD en NASH door een combinatie van factoren. Ten eerste heeft de groep een lange en unieke track record op het onderzoek naar hepatische

stellaat cellen die een cruciale rol spelen bij de ontwikkeling van NASH. Ten tweede heeft de groep een unieke expertise opgebouwd op het bestuderen van veranderingen in lipiden metabolisme in het algemeen en in het bijzonder tijdens de activatie van hepatische stellaat cellen. Ten derde heeft de groep de beschikking over een unieke centrale onderzoeksfaciliteit waarin op een geïntegreerde manier zowel lipidomics als metabolomics uitgevoerd kan worden, alsmede door middel van bioinformatics analyse de data uitputtend geanalyseerd kunnen worden. Ten vierde en tot slot zal de groep een uniek in vitro 'NASH-in-a-dish' celweek systeem ontwikkelen geoptimaliseerd voor de lipidomics en metabolomics experimenten. De uniekheid en de potentie van dit nieuw te ontwikkelen cel systeem is afgelopen maand bevestigd door de toekenning van een prestigieuze VENI beurs aan een getalenteerde postdoc op precies dit NASH-in-a-dish systeem. Deze 4 punten gecombineerd leidt er ons inziens toe dat het beoogde onderzoek zoals mede beschreven in de DEC aanvraag uniek is en nergens anders in de wereld op deze wijze uitgevoerd wordt of op korte termijn kan worden.

Een deel van dit antwoord is verwerkt in de herziene aanvraag (zie achtergrond 3.1).

U heeft eerder onderzoek gedaan en daarbij 'twee targets' bestudeerd. Kunt u kort aangeven wat de onderzoeksresultaten (of de onderliggende mechanismen) zijn? De DEC geeft daarbij aan dat het ook mogelijk is - ingeval gegevensbescherming belangrijk is - om een vertrouwelijke bijlage bij de aanvraag te voegen, die alleen bestemd is voor oordeelsvorming in de DEC. Het is zelfs mogelijk om alleen inzage te geven in vertrouwelijke gegevens.

→ De onderzoekers hebben de DEC vertrouwelijk inzage gegeven en de vraag voldoende beantwoord.

Het antwoord op deze vraag van de DEC is niet opgenomen in de herziene aanvraag.

U heeft aangegeven op zoek te zijn naar heel specifieke markers (MK2) in de stellaatcellen. De DEC vindt dit heel verhelderend. Kunt u dit toevoegen indien openbaar of vertrouwelijk ter inzage aan de commissie geven (zie hiervoor)?

U geeft aan dat mogelijkerwijze een hele reeks knock outs ingezet zullen worden voor het onderzoek. Het is niet duidelijk op basis van welke hypothese voor deze knock-outs gekozen werd en daarom blijft het onduidelijk of die allemaal nodig zijn. U kunt ook overwegen dit open te laten in deze fase en aangeven dat u van enkele belangrijke targets (hypothese-gedreven) KO dieren wilt gaan gebruiken. Een indicatie van aantal en van eventuele inclusie- of exclusiecriteria kan daarbij behulpzaam zijn.

Dit is geen doel op zich van deze aanvraag (wordt ook niet als zodanig benoemd) omdat dit niet essentieel is voor de uitvoering van deze aanvraag. Tijdens het overleg met de DEC commissie werd aangegeven dat het ontbreken van een geschikte specifieke markers het stellaatcel onderzoek in algemene zin wel bemoeilijkt, zowel op histologisch niveau, als ook op celbiologisch en biochemisch niveau, vooral in systemen met gemengde cel typen en/of bij het maken van stellaatcel-specifieke knockouts. Wel is het zo dat uit de analyses van doestelling 1 (vergelijking van rustende en geactiveerde stellaatcellen) nieuwe en potentieel unieke markers tevoorschijn kunnen komen (bijv. uit transcriptomic analysis), specifiek voor rustende en/of geactiveerde stellaatcellen. Indien dit het geval is, zullen we zeker niet nalaten dit verder te

onderzoeken, maar de verwachting is dat hiervoor geen muizen experimenten noodzakelijk zijn.

We willen zeker gebruik maken van de suggestie van de DEC commissie om de inzet van knockout muizen open te laten en alleen aan te geven dat we van enkele belangrijke targets (hypothese-gedreven) KO dieren.

In de herziene aanvraag is dit laatste deel (gebruik -KO-muizen) van ons antwoord op de vraag van de DEC verwerkt.

Stellaatcellen zijn commercieel beschikbaar. U geeft aan juist van genetisch gemodificeerde dieren de cellen nodig te hebben en daarom dierproeven te willen doen. Wilt u dit verduidelijken?

Dit berust op een hardnekkig misverstand. Stellaatcellen zijn weliswaar commercieel beschikbaar, maar deze zijn zonder uitzondering al geactiveerd en daarmee niet bruikbaar voor ons onderzoek. Dit wordt vaak niet benoemd en onderzoekers die niet gespecialiseerd zijn in stellaatcellen zijn zich hiervan vaak niet bewust en benoemen het niet in hun publicaties. Het is essentieel voor ons onderzoek zoals beschreven in de DEC aanvraag om over rustende stellaatcellen te kunnen beschikken. Op dit moment is het alleen mogelijk om rustende stellaatcellen te isoleren uit verse levers. De essentie van doelstelling 1 van de aanvraag is juist om na isolatie deze cellen rustend te houden voor langere tijd zodat deze cellen beter bestudeerd, gekarakteriseerd en vergeleken kunnen worden met geactiveerde stellaatcellen. De moeilijkheden in het omgaan met rustende stellaatcellen is waarschijnlijk één van de redenen waarom er relatief weinig onderzoek wordt gedaan naar de stellaatcel als target voor de behandeling van NAFLD/NASH (zie bijlage 1: slecht 4 van de 1306 clinical trials die op dit moment gaan zijn naar de behandeling van NASH benoemen de stellaatcellen).

U geeft aan juist van genetisch gemodificeerde dieren de cellen nodig te hebben en daarom dierproeven te willen doen.

We begrijpen niet goed wat de DEC hier precies mee bedoeld en waar in de aanvraag dit statement staat. We zullen in eerste instantie (op de LRAT-KO-muis na) met name HSC gebruiken uit WT-muizen (zie hierboven reden voor gebruik van vers geïsoleerde cellen).

Kunt u in de achtergrondsectie van het formulier in het kort opnemen welke onderzoeken naar therapievormen (en de onderliggende werkingsmechanismen) die ook gericht zijn op leverontsteking momenteel gaande zijn? Hiermee kunt u uw model wellicht ondersteunen en bevestigen.

Dieet: *veranderingen van life style, om vet intake te verlagen, om NALFD te voorkomen of te bestrijden.*

1. Semmler, G., Datz, C., Reiberger T., and Trauner, M. (2021) Diet and exercise in NAFLD/NASH: Beyond the obvious. *Liver International*41, 2249-2268.

Drugs: *drugs in clinical trials: Zie bijlage 1. Of note: none of the clinical trial phase III in 2019 have yet been approved. For example, obeticholic acid obtained originally the 'FDA breakthrough designation', but in 2023 the FDA panel voted 12-2 against approval for obeticholic acid for pre-cirrhotic patients with liver fibrosis due to nonalcoholic steatohepatitis.*

1. Tacke, F., and Weiskirchen, R. (2018). An update on the recent advances in antifibrotic therapy. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* 12, 1143–1152. 10.1080/17474124.2018.1530110.

Het antwoord op deze vraag van de DEC is niet opgenomen in de herziene aanvraag

3.4 Strategie

Kunt u duidelijker vermelden wat u concreet met dit project wilt bereiken? De DEC ziet dit onderzoek nu als een inventarisatie van veranderingen die optreden bij de overgang van rustende naar actieve stellaatcellen met lipidomics en metabolomics om later het proces te begrijpen. Misschien volstaat het om duidelijk aan te geven hoe en in welke opzichten de 'verzamelde gegevens' bijdragen aan de vier doelstellingen die u al heeft beschreven?

Doelstelling is het identificeren van zgn key-nodes, cruciale enzymen of biochemische paden, die betrokken zijn bij het ontstaan van leverschade (NASH) en leverkanker.

De reden voor focus op keynodes is omdat het effect van inhibitoren in deze keynodes op cellulaire processen het grootst zal zijn en secundaire effecten zoveel mogelijk vermeden worden. Het accent ligt daarbij op key-nodes in hepatische stellaatcellen (doelstelling 1-4), maar mogelijk worden ook key-nodes in hepatocyten en/of macrofagen gevonden (doelstelling 2-4). Zoals aangegeven in de aanvraag hopen we een beperkt aantal keynodes (4 in doelstelling 1 en x in doelstelling 3b) te kunnen valideren door bestudering van de cellulaire response met behulp van inhibitoren.

Het antwoord op deze vraag van de DEC is opgenomen in de herziene aanvraag (3.4 Strategie).

Is de wijziging in de strategie van invloed op het aantal (transgene) dieren? Het is belangrijk dat het aantal dieren duidelijk verantwoord blijft (onder meer hoeveel ex vivo experimenten met de cellen van 1 dier kunnen worden gedaan).

De doelstellingen blijven hetzelfde, dus het aantal proefdieren blijft hetzelfde

Bijlage 1

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Als parameters benoemt u nu de technieken. Kunt u in plaats van technieken zoveel mogelijk de specifieke parameters betrokken bij intra- en intercellulaire processen benoemen?

Op alle punten waar dit mogelijk is hebben we de specifieke uitkomstparameters benoemd en gebruikt om het aantal benodigde dieren statistisch te onderbouwen.

G. Vervanging, vermindering en verfijning: Wilt u met de IVD/3R Centre de mogelijkheden van de humane weefselbank verkennen voor dit onderzoek? Kunt u in de aanvraag aangeven waarom dit wel of geen optie is?

Dit is geen optie om twee redenen: i) uit bevroren lever materiaal kunnen geen bruikbare cellen meer geïsoleerd worden; ii) voor isolatie uit niet-bevroren levers is het noodzakelijk om eerst een lever perfusie uit te voeren. Lever perfusie is niet mogelijk op kleine stukjes lever. Het zou dus noodzakelijk zijn om verse, intacte, en gezonde levers te krijgen van donoren die niet lijden aan NALFD en NASH zodat onmiddellijk na overlijden van de patiënt een leverperfusie in gang gezet kan worden. De enige levers die hiervoor geschikt zijn, worden ingezet voor lever transplantatie. Dit traject is dus niet haalbaar.

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. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. De ernstige en chronische aandoening NASH, Niet Alcoholische SteatoHepatitis (leverontsteking), als gevolg van leververvetting, die zich verder kan ontwikkelen tot levercirrose en een risicofactor is voor het ontstaan van leverkanker (HCC, hepatocellulair carcinoom) is tot op heden niet te verhelpen behalve door middel van een levertransplantatie. Er zijn ongeveer twintig producten/medicijnen in ontwikkeling maar nog niet op de markt gebracht. Vanuit hun eigen expertise op het gebied van lipidomics en metabolomics willen de onderzoekers bijdragen aan de mogelijkheden om NASH behandelbaar te maken.

Voor het onderzoek ten aanzien van de identificatie van nieuwe mogelijkheden voor de behandeling van leverontsteking en leverkanker zijn vier doelstellingen opgesteld waarvoor 1108 volwassen muizen aangevraagd zijn, maar het onderzoek zelf bestaat uit *ex vivo/ in vitro* experimenten. De dierproef bestaat uit het harvesten van (verschillende typen) levercellen in een terminaal experiment. De hepatische stellaatcellen (HSC's) kan men nu in rustende toestand kweken en in geactiveerde cellen omzetten. Omdat activatie van HSC's voorafgaat aan, dan wel leidt tot het ontstaan van NASH wil men dit gebruiken om een *in vitro* model van NASH op te zetten en te valideren in *in vitro* experimenten waar NASH en HCC (leverkanker-achtige afwijkingen) worden opgewekt.

Het unieke aan dit project is volgens de onderzoekers dat men nu in staat is HSC's uit de lever te isoleren, deze cellen in rustende (quiescent) toestand te kweken en onder experimentele condities kan activeren. De switch van gezonde naar "ontstoken" levercellen is belangrijk voor het begrijpen van de pathofysiologie van NASH. Verder is de inzet van het Transwell systeem (doel 3) voor dit onderzoek essentieel, omdat daarmee verschillende typen levercellen in co-cultures gekweekt kunnen worden, maar de individuele celtypes wel toegankelijk blijven voor onderzoek.

De aanvraag komt het meest overeen met een combinatie van de voorbeelden 1A en 3A uit de Handreiking "Invulling Definitie Project" waarbij de vier subdoelen duidelijk bijdragen aan de hoofddoelstelling.

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 doelcategorie, te weten fundamenteel onderzoek, sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is fundamentele kennis opdoen en inzicht verwerven over het ontstaan van leverontsteking en -kanker. Het uiteindelijke doel van het project is het identificeren van geschikte aangrijpingspunten voor ontwikkeling van een therapie voor ontstekingen en kanker aan de lever, omdat een behandeling nu nog niet mogelijk is. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het biomoleculair onderzoeksveld en de behoeften vanuit de gezondheidszorg en patiënten met ernstige leverontsteking of leverkanker.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: proefdieren, onderzoekers, NASH en leveroncologie patiënten. De muizen hebben er belang bij gevrijwaard te blijven van het terminaal ongerief als gevolg van de dierproef. Voor de proefdieren is er op termijn ook een voordeel te behalen. Één van de doelstellingen is de ontwikkeling van een *in vitro* systeem (NASH in a dish), waardoor in de toekomst minder dieren nodig zullen zijn voor dit type onderzoek. Humane patiënten met leverontsteking of -kanker hebben in ieder geval een groot belang bij dit onderzoek aangezien deze studie mogelijk kan leiden tot een behandeling voor deze ernstige aandoeningen en de kwaliteit van leven van patiënten kan verhogen. De onderzoekers hebben met hun 'ongoing' onderzoek, langdurige inzet op dit onderzoeksgebied en gebruikmakend van innovatieve technologieën groot belang bij positieve resultaten. Voor de individuele onderzoeker kan het van belang zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de ervaren onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. Tevens is er kennisoverdracht door een ander instituut in verband met het co-cultuursysteem. Dit draagt eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. In vorig onderzoek zijn twee 'targets' bestudeerd. De onderzoekers hebben de DEC vertrouwelijk inzage gegeven in de aard van deze targets en de DEC is van mening dat dit voldoende onderbouwd is. 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)

Voor het onderzoek worden naast wildtype muizen ook genetisch gemodificeerde muizen gebruikt. De inzet van KO-muizen is volgens de DEC voldoende toegelicht. Deze muizen worden verkregen via andere onderzoeksgroepen of commerciële leveranciers. In dit project is geen aanvraag voor het modificeren van dieren opgenomen.

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.

11. Er is uitsluitend sprake van terminaal ongerief. Alle muizen verbloeden onder volledige anesthesie na de noodzakelijke leverperfusie voor het verkrijgen van de stellaatcellen. De (deels genetisch gemodificeerde) dieren ondergaan geen andere handelingen die als dierproef kunnen worden aangemerkt. De DEC is het eens met deze werkwijze.

12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door de leverperfusie (onder narcose).

13. Er zijn geen humane eindpunten te verwachten en de DEC vindt dit juist ingeschat.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderzoeker heeft de DEC voldoende overtuigd dat de benodigde ongeactiveerde stellaatcellen niet commercieel verkrijgbaar zijn, en dat gebruik maken van de humane weefselbank eveneens niet mogelijk is. De leverperfusie bij levende (transgene) proefdieren is dan ook noodzakelijk om de vers geïsoleerde primaire hepatische stellaatcellen (rustend fenotype) en de geactiveerde HSC's (geactiveerd fenotype) met elkaar te kunnen vergelijken.

15. Het aantal te gebruiken dieren (1108 muizen) 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. Zo worden waar mogelijk organoïden gebruikt en zijn de proefdieren volwassen omdat het aantal HSC's dan toegenomen is en hierdoor minder muizen benodigd zijn. Tevens draagt dit project bij aan de ontwikkeling van *in-vivo* systemen waardoor voor (toekomstig) onderzoek dieren bespaard kunnen blijven voor dit type onderzoek.
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.
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 ingezet worden. Omdat er verschil is in het metabolisme van mannelijke en vrouwelijke dieren worden beide standaard onderzocht.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Alle muizen verbloeden tijdens de leverperfusie onder volledige narcose (terminaal ongerief). De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, 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 of het belang van dit onderzoek, namelijk meer inzicht verkrijgen in het ontstaan van leverontsteking en leverkanker, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van de 1108 proefdieren plaats, met terminaal ongerief.
Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er mogelijk toe bijdragen dat er, een tot nu toe ontbrekende, therapie ontwikkeld kan worden voor deze

ernstige leveraandoeningen. Het is aannemelijk dat de fundamentele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren en terminaal ongerief noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat meer fundamentele kennis over het ontstaan van leverontsteking en -kanker een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe hoofddoelstelling met de vier subdoelen behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202317226

Bijlagen

2

Datum 14 juli 2023

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 14 juli 2023. Het gaat om uw project "Rol van metabolieten in leverfibrose en leverkanker". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD10800202317226. 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, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Datum:

14 juli 2023

Aanvraagnummer:

AVD10800202317226

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Onderzoeker-Docent
Afdeling: Department of Biomecular Health Sciences
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

Over uw project

Geplande startdatum: 5 september 2023
Geplande einddatum: 4 september 2028
Titel project: Rol van metabolieten in leverfibrose en leverkanker
Titel niet-technische samenvatting: Identificeren van nieuwe mogelijkheden voor de behandeling van leverontsteking en van leverkanker
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 980,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Utrecht

Datum:

10 juli 2023



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD10800202317226
Bijlagen
2

Datum 14 juli 2023
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 14 juli 2023
Vervaldatum: 13 augustus 2023
Factuurnummer: 2317226
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10800202317226	€ 980,00

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 te 's Gravenhage.

From: info@zbo-ccd.nl
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht; CvB postmap \(UBD BS\)](#)
Cc: [redacted] dec-utrecht@umcutrecht.nl
Subject: Aanhouden AVD10800202317226
Date: maandag 11 december 2023 08:42:02

CAUTION: This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [redacted]

Op 14-07-2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Rol van metabolieten in leverfibrose en leverkanker" met aanvraagnummer AVD10800202317226. 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:

Niet technische samenvatting

Kunt u de NTS in het Excel format toezenden?

Onduidelijkheden

In het projectvoorstel onder 3.4.3 geeft u aan dat de titel van de bijlage dierproeven 'Isolatie primaire levercellen uit wildtype en genetisch gemodificeerde muizen' is. De titel van de bijlage zelf is 'Isolatie primaire levercellen uit wildtype en KO muizen'. Kunt u de titels consistent maken met elkaar?

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 dit bericht 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

[redacted]
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202317226

Bijlagen

3

Datum 13 december 2023

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 14 juli 2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Rol van metabolieten in leverfibrose en leverkanker" met aanvraagnummer AVD10800202317226. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 13 december 2023 tot en met 4 september 2028.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 6 december 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 11 december 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het consistent maken van de titel van de bijlage dierproeven met het projectvoorstel en het aanpassen van de Niet Technische Samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

13 december 2023

Aanvraagnummer:

AVD10800202317226

Overwegingen

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

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 93118, 2509 AC 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Universiteit Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 december 2023 tot en met 4 september 2028, voor het project "Rol van metaboliëten in leverfibrose en leverkanker" met aanvraagnummer AVD10800202317226, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker-Docent. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 14 juli 2023
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 6 december 2023;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1. Isolatie primaire levercellen uit wildtype en genetisch gemodificeerde muizen, zoals ontvangen op 13 december 2023;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 13 december 2023;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 6 december 2023
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 13 december 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1. Isolatie primaire levercellen uit wildtype en genetisch gemodificeerde muizen			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	1.108	100,0% Terminaal

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD10800202317226

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:
AVD10800202317226

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn 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 van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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.