

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015227								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlagen beschrijving dierproeven 1,2,3,4			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Mail aanvullende informatie 6-10-2015				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	
10	Mail beschikking 14-10-2015				x		x	x	

27 AUG. 2015



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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td>Geert Grooteplein-Noord 9</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9102</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6525EZ Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein-Noord 9	Postbus	9102	Postcode en plaats	6525EZ Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein-Noord 9																
Postbus	9102																
Postcode en plaats	6525EZ Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="width: 50%;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2">Onderzoeker in opleiding</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeker in opleiding		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Onderzoeker in opleiding																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="width: 50%;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2">PhD student</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	PhD student		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	PhD student																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 2 5 . 0 9 . 2 0 1 5
- Einddatum 2 5 . 0 9 . 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Botvervangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

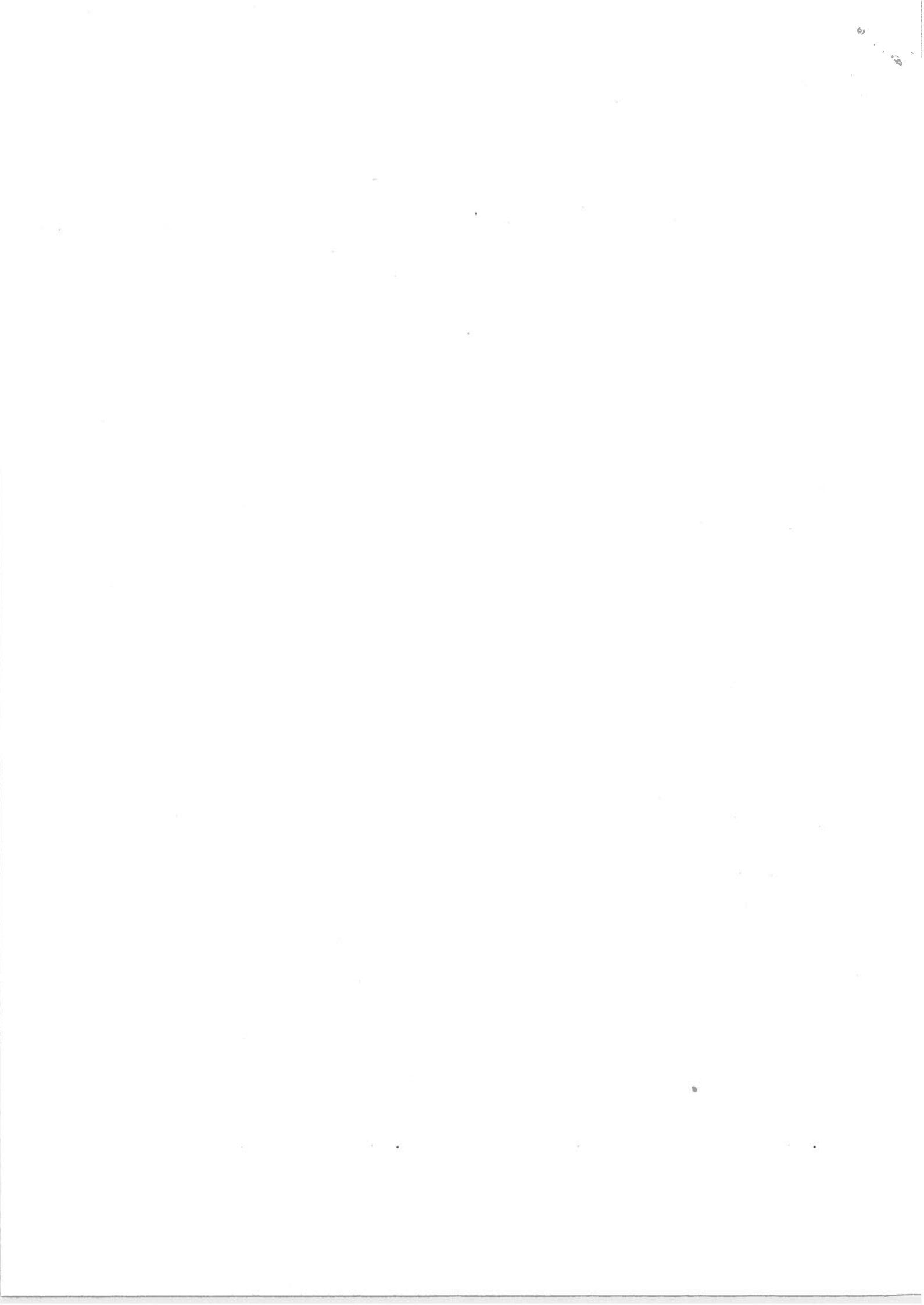
Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 25 - 08 - 2015

Handtekening [REDACTED]



Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> Higher education or training |
|-----|---|--|

 Forensic enquiries

 Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

The annual average proportion of the US population with a musculoskeletal condition has increased from 28 percent to more than 33 percent of the population between 1996 to 1998 and 2009 to 2011 (U.S. Department of Health and Human Services, 1996-2011). Impaired bone regeneration is one of these musculoskeletal conditions. Bone possesses the intrinsic capacity for regeneration as part of the repair process in response to injury (Bates and Ramachandran, 2007; Einhorn, 1998). Bone is regenerated with its pre-existing properties largely restored, and with the newly formed bone being eventually indistinguishable from the adjacent uninjured bone (Einhorn, 1998). However, there are cases of fracture healing in which bone regeneration is impaired, such as delayed union or non-union. Additionally, there are conditions in which bone regeneration is required in large quantity, beyond the normal potential for self-healing, such as for skeletal reconstruction of large bone defects created by trauma, infection, tumor resection and skeletal abnormalities, or cases in which the regenerative process is compromised (Dimitriou et al., 2011), including osteoporosis and diabetes mellitus. In these cases, the bone defects have to be reconstructed surgically by use of bone grafting materials. Bone is the second most commonly implanted material in the human body, after blood transfusion (Marino and Ziran, 2010). The need for bone grafting procedures is increasing worldwide. The number of bone grafting procedures ranges from 0.5 million in the US to 2.2 million worldwide annually (Calori et al., 2011). This is amongst other causes due to systemic diseases that affect the bone regenerative capacity of the body in a negative way, predominantly being osteoporosis and diabetes mellitus. Various medical practitioners, for example in trauma surgery, plastic and reconstructive surgery, orthopedics and dentistry face the complexity of reconstructing bone defects every day.

Different bone regenerative treatments are currently clinically applied. Autografting, in which autologous bone is used to regenerate bone defects, is the mostly used and most well known procedure for bone regenerative treatment worldwide. The major disadvantage of autografting is the need for an additional surgical procedure and site to harvest donor bone. This autologous donor bone is commonly harvested from the crista iliaca, which is easily accessible and contains a relatively large amount of corticocancellous bone (Giannoudis et al., 2005). The harvest of autologous donor bone from the crista iliaca is associated with risk of gait disturbances, deviation in form, meralgia paresthetica (neuropraxia N. cutaneus femoralis lateralis), or herniation of intestines. An alternative treatment modality is the use of allograft bone, in which processed cadaver bone is transplanted into the patient. However, bone allograft is not always accepted as a substitute for several reasons, including (i) undesired graft-versus-host reactions, (ii) graft necrosis, (iii) delayed incorporation, and (iv) relatively high costs (Giannoudis et al., 2005). Finally, similar to autologous bone grafts, allografts suffer from limited availability (Banwart et al., 1995).

In view of the drawbacks of autologous and allogeneous bone grafts, synthetic bone graft materials have become heavily explored as alternatives. As synthetic graft materials are off-the-shelf available, a second surgical procedure to harvest autologous bone is not necessary and no donor site complications can occur. A variety of synthetic graft materials have been evaluated as scaffolds in bone repair, including the calcium phosphate (CaP) based bioactive ceramic hydroxyapatite (HA), beta-tricalcium phosphate (β -TCP), and biphasic calcium phosphate (BCP), bone cements, bioactive glasses, and biodegradable synthetic polymers (Gu et al., 2013). Among the synthetic graft materials, CaP-based bone substitute materials have been mostly explored. The main advantage of these materials is the excellent biocompatibility due to their chemical similarity to the natural mineral of bone tissue (Ruhé et al., 2006; Habraken et al., 2006). Their favorable biological performance is characterized by bioactivity (i.e. the capacity to directly bond to bone) and osteoconductive properties (i.e. to guide bone growth over their surface).

A major drawback of CaP-based bone substitute materials, however, is the generally poor degradation. Ideally, the degradation is balanced with new bone formation to warrant stability and mechanical strength during the regenerative phase. CaP-based bone substitute materials can be degraded by two parallel pathways: active resorption in a cell-mediated process, and passive resorption in an acellular process dependent on the chemical solubility of the material. Absence of adequate porosity of the material delays degradation and impedes cell ingrowth (Gauthier et al., 1998). Several approaches have been explored to introduce porosity and therefore improve degradability (Barralet et al., 2002; Habraken et al., 2008, Lopez-Heredia et al., 2012). This can be achieved by the addition of other materials that have a faster degradation rate than the cement (i.e. CaP cement (CPC)). When these materials degrade, a porous structure remains, allowing fluid flow throughout the cement and therefore improving degradation. These materials can be added in form of fast-degrading microparticles, e.g. made of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), that dissolve after cement setting (Ruhé et al., 2005; Habraken et al., 2008; Qi et al., 2008; Félix Lanao et al., 2011).

For clinical purposes, it is important that degradation can be controlled, predicted and monitored, and hence new bone formation can be regulated in healthy and compromised conditions (e.g. osteoporosis and diabetes mellitus (DM)). Particularly in elderly patients that already suffer from decreased regenerative capacity, additional compromised conditions that interfere with osteoblastic bone formation and/or osteoclastic bone resorption are likely to affect the biological performance of bone grafts. Osteoporosis and DM interfere drastically with bone regeneration, affecting general wound healing processes and the balanced bone homeostasis (Fuegl et al., 2011).

Osteoporosis: osteoporosis is the most common bone disease in the US. The prevalence is expected to intensify, as the population ages (Pei et al., 2015). Osteoporotic patients present an imbalance in the level of bone formation and resorption during bone remodeling, resulting in a reduced bone mineral density causing lower bone mass and deterioration of bone tissue micro-architectures (Fini et al., 2004). Therefore, bone healing around dental and orthopedic implants placed in osteoporotic patients is negatively influenced and more prone to implant failure (Alghamdi et al., 2014).

Diabetes mellitus: DM affects inflammatory processes that precede and are part of wound healing. Many studies performed in animal models, and in rat models in particular, suggest that insulin deficiency can result in decreased bone integrity. For instance, measurements of bone strength in DM models have revealed that DM and insulin deficiency can have a negative impact on bone strength and bone composition. In a long-term DM model, Einhorn et al. (1988) showed that diabetic bones display specific defects of bone mineralization, including decreased hydroxyapatite crystal perfection, decreased calcium-to-phosphate composition of the ash, and decreased ash content in certain bones such as the tibial metaphysis.

Osteoporotic and diabetic patients undergoing medicinal therapy may present a complex bone healing process, not necessarily positive or similar to the healthy condition (Iizuka et al., 2008; Hou et al., 2011). During fracture healing, the use of bisphosphonates (i.e. the most common anti-osteoporotic drug) or insulin (i.e. the general treatment modality for diabetic patients) is controversial because of the conflicting action of these medications on osteoclastic activity (Thomas et al., 1998; Schindeler et al., 2008). Osteoclasts are important for remodeling the callus into cortical bone (Einhorn et al., 1998) but insulin/bisphosphonate inhibits osteoclast-mediated bone resorption in order to prevent bone loss and improve bone strength (Thomas et al., 1998; Murakami et al., 1995).

For these reasons, it is necessary to address:

- The biological performance of CaP-based bone substitute materials (i.e. the degradation rate of these materials and replacement by new bone) under different health conditions;
- The specific mechanisms of bone response to the administered medication for DM and osteoporosis.

References

-U.S. Department of Health and Human Services, The Burden of Musculoskeletal Conditions in the United States, 1996-2011

- Bates P, Ramachandran M. *Basic Orthopaedic Sciences*. 2007:123-134
- Einhorn TA. *Clin Orthop Relat Res*. 1998, 355(Suppl):S7-21
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. *BMC Medicine*. 2011 9:66
- Marino JT, Ziran BH. *Orthop Clin North Am*. 2010 Jan;41(1):15-26
- Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamont C. *Injury, Int. J. Care Injured* 42 (2011) S56–S63
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. *Injury, Int. J. Care Injured* (2005) 36S, S20—S27
- Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995 May 1;20(9):1055-60
- Gu Y, Huang W, Rahaman MN, Day ED. *Acta Materialia* 9 (2013) 9126-9136
- Ruhé PQ, Hedberg-Dirk EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA, Mikos AG. *Tissue Eng*. 2006 Apr;12(4):789-800
- Habraken WJ, Wolke JG, Mikos AG, Jansen JA. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2006;17(9):1057-74
- Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. *Biomaterials* 19 (1998) 133-139
- Barralet JE, Grover L, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR. *Biomaterials* 2002;23(15):3063-72
- Habraken WJ, Zhang Z, Wolke JC, Grijpma DW, Mikos AG, Feijen J, Jansen JA. *Biomaterials* 29 (2008) 2464-2476
- Lopez-Heredia MA, Sariibrahimoglu K, Yang W, Bohner M, Yamashita D, Kunstar A, van Apeldoorn AA, Bronkhorst EM, Félix Lanao RP, Leeuwenburgh SC, Itatani K, Yang F, Salmon P, Wolke JG, Jansen JA. *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 404-414
- Ruhé PQ, Hedberg EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA. *Inc. J Biomed Mater Res* 74A: 533–544, 2005
- Habraken WJ, de Jonge LT, Wolke JG, Yubao L, Mikos AG, Jansen JA. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008
- Qi X, Ye J, Wang Y. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1837-1845
- Félix Lanao RP, Leeuwenburgh SC, Wolke JG, Jansen JA. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3459-3468
- Fuegl A, Tangl S, Keibl C, Watzek G, Redl H, Gruber R. *Clin Oral Implants Res*. 2011 May;22(5):524-9
- Pei M, Li J, McConda DB, Wen S, Clovis NB, Danley SS. *Bone* 78 (2015) 1-10.
- Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, Nicolini A, Carpi A. *Biomed Pharmacother*. 2004 Nov;58(9):487-93
- Alghamdi HS, van den Beucken JJ, Jansen JA. *Tissue engineering: Part C Volume 20, Number 6, 2014*.
- Einhorn TA, Boskey AL, Gundberg CM, Vigorita VJ, Devlin VJ, Beyer MM. *J Orthop Res*. 1988;6(3):317-23
- Iizuka T, Matsukawa M. *Climacteric*. 2008 Aug;11(4):287-95

-Hou CJ, Liu JL, Li X, Bi LJ. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012 Mar;41(3):400-7

-Thomas DM, Udagawa N, Hards DK, Quinn JM, Moseley JM, Findlay DM, Best JD. *Bone.* 1998 Sep;23(3):181-6

-Schindeler A, Ramachandran M, Godfrey C, Morse A, McDonald M, Mikulec K, Little DG. *J Orthop Res.* 2008 Jan;26(1):65-74.

-Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T. *Bone.* 1995 Aug;17(2):137-44.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The aim of this project is to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions). The aim of this project is achievable because of the knowledge of bone regenerative treatments and ceramics that is internationally gained in the past decades, on which this project is founded. An improvement in terms of biological performance of CaP-based bone substitute materials as we know them today is expected because of the ability to combine CaP-based bone substitute materials with fast-degrading materials that induce porosity (porogens) and therefore improve the degradation rate and the ability to combine CaP-based bone substitute materials with bone stimulating agents to improve the formation of new bone. Furthermore, achievement of this aim is supported by the fact that the CaP-based bone substitute materials that will be implanted *in vivo* were living up to the standards (i.e. ability to set, cohesive and easy to use) during *in vitro* testing before being implanted *in vivo* and that *in vivo* procedures (i.e. surgery) and histological analysis will be performed by researchers that have the available expertise.

3.3 Relevance

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

Research is necessary to develop treatment modalities that enable optimized degradation properties and accelerated degradation of synthetic CaP-based bone substitute materials to allow new bone formation. From a material perspective, these modalities have been explored by combining synthetic CaP-based matrices (e.g. CaP cement (CPC)) with fast-degrading materials as porogens (i.e. polymers, bioinorganics, other CaP-based

materials) and by combining synthetic CaP-based matrices with bone stimulating agents (e.g. bioinorganics). Pre-clinical studies provide further insight in the biological performance of these CaP-based bone substitute materials in an *in vivo* environment.

It is scientifically, as well as socially relevant to investigate the difference in biological performance of bone substitute materials in healthy and compromised conditions (i.e. conditions compromising bone regeneration – osteoporosis and diabetes mellitus) because these compromised conditions are likely to affect the biological performance of bone grafts, because of their interference with osteoblastic bone formation and/or osteoclastic bone resorption.

From a social perspective, once a reliable, controlled and compliant medical device for bone regeneration purposes can be made clinically available for healthy patients with bone defects as well as for patients with a compromised medical condition linked to impaired bone healing – such as the above mentioned patients with osteoporosis and diabetes – with bone defects, an increasing number of patients with dental, maxillofacial, orthopedic and spinal bone defects can benefit from this.

3.4 Research Strategy

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

The project is designed in such a way that the biological performance of the developed synthetic CaP-based bone substitute materials can be evaluated on:

1. Efficacy in terms of biocompatibility of the developed CaP-based bone substitute material.
2. Efficacy in terms of controlled degradability of the developed CaP-based bone substitute material / new bone formation at the implant site in:
 - Healthy conditions
 - Compromised health conditions that will be treated (osteoporosis and diabetes mellitus)
3. Efficacy in terms of enhanced bone formation at the implant site by release of drugs (e.g. antibiotics) or substances that improve bone formation (e.g. bioinorganics) from the CaP-based bone substitute material.

The developed CaP-based bone substitute materials will be screened for biocompatibility and biological performance in healthy conditions and in osteoporotic or diabetic conditions that will be treated with medication, because this disease would also be treated in human patients. After screening, the long-term biological performance of the materials and performance of the materials in an animal bone model comparable to the human bone model will be evaluated. Efficacy in terms of accelerated degradability and new bone formation at the implant site will be evaluated in comparison to a legally marketed bone substitute.

Furthermore, release of drugs (e.g. antibiotics) or substances (e.g. bioinorganics) from the CaP-based bone substitute materials will be investigated to improve the material in terms of decreasing the infection risk of the surgical site and enhancing new bone formation, both improving and accelerating the healing of the bone defect.

Evaluation on degradation of the developed synthetic CaP-based bone substitute materials and new bone formation at the implant site will consist of descriptive histology, quantitative histomorphometry and evaluation of sequential fluorochrome labeling.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

All developed synthetic CaP-based bone substitute materials are tested *in vitro* on handling properties, (i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material) before they will be *tested in vivo*. In the *in vivo* studies, the biological performance of the CaP-based bone substitute materials will be evaluated using ectopic implantation of pre-set scaffolds and either orthotopic injection of CaP cements (CPCs) or orthotopic implantation of pre-set scaffolds in bone defect models. Efficacy of the developed synthetic CaP-based bone substitute materials will be proven by evaluation of the implanted materials in various animal models:

- Ectopic implantation of the materials in rats to evaluate biocompatibility and the ability of ectopic bone formation.
- Orthotopic implantation of the materials, creating bone defects in healthy rats, rabbits and goats (in this specific order on the timeline of this project), making an increase in the size of the defects possible and providing an increase in similarity to the human bone model. The defects will be filled with the developed synthetic bone substitute material.
 - In healthy rats and rabbits bone defects will be created in the femora (bilaterally).
 - In goats bone defects will be created in the femora and iliac crests (bilaterally) and by performing sinus floor elevation procedures (bilaterally). All defects (including the sinus floor) will be filled with the developed CaP-based bone substitute material.
- Orthotopic implantation of the materials, creating bone defects in health compromised animal models. Achieving compromised conditions by inducing osteoporosis or diabetes. Health compromised conditions will be conditions in which a systemic disease (e.g. osteoporosis or diabetes) is chemically or surgically induced. In case of an animal model with a systemic disease, this disease will be treated with the appropriate drugs as would be done in humans.

The basic outline of the different components of this project will be as follows:

The first step of the *in vivo* research strategy (after *in vitro* testing) is screening of the developed synthetic bone substitute materials for biocompatibility and biological performance in healthy rats. This will be done by subcutaneous implantation (ectopic) and implantation in both

femoral condyles (orthotopic). Rats are the 'lowest animal species' suitable for testing bone substitutes. Simultaneously, bone substitute materials will be tested orthotopically in rats with treated osteoporosis or diabetes to evaluate their performance in terms of new bone formation in these conditions.

Appealing CaP-based bone substitute materials will then be tested in a rabbit femoral condyle model, allowing larger femoral condyle bone defects and long-term follow-up. This is necessary to evaluate the long-term performance of the implanted materials in a defect that is large enough to need a bone substitute material to heal and would not heal without a bone substitute material. The long-term follow-up time is based on the time point at which implantation time coincides with complete degradation of the material and new bone formation. In rabbits this is 26 weeks. Because of the difference in bone metabolic rate between smaller (rabbit) and larger animals, the rabbit animal model is the most suitable model for long-term follow up of the biological performance of bone substitute materials.

Making an increase in the size of the defects possible and providing an increase in similarity to the human bone model, goats are used to perform implantation of the most appealing CaP-based bone substitute materials orthotopically (i.e. femoral condyles, iliac crests and sinus floor elevation procedures). The goat is a suitable animal model for testing human implants and materials as they are considered to have a metabolic rate and bone-remodeling rate similar to that of humans (Anderson et al., 1999; Spaargaren, 1994). Bone healing capacity of goat bone is comparable with that of humans (Dai et al., 2005). The goat is also a suitable animal model because of the size and shape of the bones and similarity in loading properties. In rabbits this cannot be tested because of the differences in stance between the species (Pearce et al., 2007). The use of multiple implantation sites (i.e. different bones) will make it possible to compare the biological performance of the materials and bone response between implantation sites. The locations of the implants are chosen based on the similarity to the clinical situation in humans (i.e. sinus elevation procedures) and based on the easy accessibility of corticocancellous bone in these bones.

A component of this project is the focus on addition of drugs or substances to the CaP-based bone substitutes to further improve the materials in terms of diminishing the infection risk at the surgical site when released from the material and – as a result or as a direct effect – by accelerating degradation and concomitant new bone formation.

The developed synthetic bone substitute materials will be compared to a legally marketed bone substitute.

References

-Anderson ML, Dhert WJ, de Bruijn JD, Dalmeijer RA, Leenders H, van Blitterswijk CA, Verbout AJ. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Jul;(364):231-9

-Spaargaren DH. *Acta Biotheor.* 1994 Dec;42(4):263-9

-Dai KR, Xu XL, Tang TT, Zhu ZA, Yu CF, Lou JR, Zhang XL. *Calcif Tissue Int.* 2005 Jul;77(1):55-61

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

The main goal of this project is to develop a synthetic CaP-based bone substitute material for clinical use in bone regeneration treatments. This synthetic bone substitute material should obey to clinical requirements, such as being safe for the patient, improving bone formation and having excellent handling properties to fit the work of the surgeon. To reach the main goal of this project, different components should be considered and tested in animal experiments.

First of all, the biological performance of the developed synthetic bone substitute material will be evaluated in rats, the 'lowest animal species' possible for research in bone regeneration and highly suitable for rapid screening of the biological performance. Simultaneously, biological performance in healthy rats will be compared to biological performance in health compromised conditions. When in rats one of the evaluated materials does not live up to the expected biological performance, this material in its current form will not be tested further in animals until it is adjusted.

When the material is showing the desired biological performance (accelerated degradation and enhanced bone formation at the implant site), the material will be tested for its long-term performance in rabbits, in which follow-up time coincides with complete degradation of the material and concomitant new bone formation.

The use of rats, rabbits and goats in this specific order (on the timeline of this project), makes an increase in the size of the defects possible and is providing an increase in similarity to the human bone model. Because of the latter, implantation of the developed CaP-based bone substitute materials in goats will provide pre-clinical results in terms of biological performance of the material most comparable to the clinical situation (i.e. in human). The release of drugs or substances that improve bone formation by direct or indirect effects will improve the material even further.

Following the different steps of this project will lead to the aim of this project: to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions).

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Bone substitutes in healthy rats
2	Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats
3	Bone substitutes in healthy rabbits
4	Bone substitutes in healthy goats

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Bone substitutes in healthy rats

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Bone regeneration depends on the interaction of bone tissue with the implanted bone substitute material. When the bone substitute material degrades, new bone can be formed at the implant site because of the resulting space. Complete bone regeneration is dependent on the degradation rate of the material (e.g. the speed at which the material degrades) and on the potential for new bone formation. Bone ingrowth can only be assessed in a living organism, specifically a mammal. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies (containing mammals) are required to investigate biological performance. Bone substitute materials will be investigated using two research lines: an ectopic (i.e. subcutaneous) implantation line and an orthotopic (i.e. femora bilaterally) implantation line. For each developed material, both lines should be investigated. Both lines can be investigated at the same time in the same rat, diminishing the number of rats needed. Ectopic implantation of the materials in rats is necessary to evaluate biocompatibility and the ability of ectopic bone formation (osteinductivity; bone formation without presence of surrounding bone). Orthotopic implantation of the materials is necessary to evaluate the biological performance in a bone defect, comparable to a clinical situation in which the bone can respond to the bone substitute material. This experimental approach leads to the objective of this study: to determine the biological performance of the developed bone substitute materials.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

The smaller the animal, the higher the metabolic rate. Therefore, the metabolic rate of the animal determines the rate and amount of new bone formation, which, in turn, dictates the relevant time points for data collection during the course of the experiment. Shorter implantation periods (i.e.

faster data sampling) are required in rats because of the fast healing (Stravopoulos et al., 2015). In this study, implantation periods will be 2 and 6 weeks (Renno et al., 2013), which allows comparison of the biological performance of the material in an early phase and a late phase of material degradation and bone regeneration. It is important to first evaluate material degradation in an early phase: when degradation is not occurring, there will be no resulting space for new bone formation and consequently there will be no interest in evaluating biological performance in a late phase. The implantation periods are suitable for rapid screening of the developed bone substitute material for histocompatibility and biological performance in terms of accelerated degradability and new bone formation at the implant site in rats. Evaluation of bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material.

References

-Stravopoulos A, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D, Klinge B. *Periodontol 2000*. 2015 Jun;68(1):55-65

-Renno AC, van de Watering FC, Nejadnik MR, Crovace MC, Zanotto ED, Wolke JG, Jansen JA, van den Beucken JJ. *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 5728-5739

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

- Bone defect surgery: bone substitute materials will be placed orthotopic (i.e. in the femora) and ectopic (i.e. subcutaneous) in healthy, skeletally mature rats under general anesthesia. A femoral bone defect is created in both femora (diminishing the number of rats needed) and filled with one CaP-based bone substitute material per femur. Both femora are operated on in one surgical session. During the surgery and post surgery, the rats will receive painkillers. After the procedure, the rats will be housed in groups according to the housing standards. The rats will receive a normal diet and will have no special housing restrictions.
- Sacrifice: the rats will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 2 or 6 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc Nijmegen and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis.

Bilateral bone defects will be created per animal (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

For determining what animal model to use in studies investigating bone implants, it is important to understand the specific bone characteristics, such as bone modeling and remodeling. Also the size of the animal must be considered to ensure that it is appropriate for the number and size of the implant chosen (Pearce et al., 2007).

For rapid screening of the biological performance of the bone substitute material, a small animal is the animal model of choice. Rats are the smallest and 'lowest' animal species suitable for bone regeneration studies. Furthermore, rats are ideal models to evaluate the performance of bone substitute materials for reasons of reliability, reproducibility, and accuracy in the obtained data.

A maximum of 12 materials (CaP-based bone substitute materials (experimental group) and a legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) will be analyzed. Per material a minimum of 6 rats are needed (i.e. 2 orthotopic and 2 ectopic implantation sites per rat) per implantation period. This means $12 \times 6 \times 2 = 144$ rats. A possible loss of up to 6 animals is taken into account. Therefore, 150 rats will be used in this part of the project. The number of rats in this study is based on achievement of the study objectives with the lowest number of animals per group possible. The rats will be skeletally mature Wistar rats from a EU-registered breeder.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat	registered breeder	150	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

C. Re-use

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate bone ingrowth and biological performance.

Reduction: a power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment. All developed synthetic bone substitute materials are tested in vitro on handling properties, i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material before they will be tested in vivo. Bilateral defects will be created to reduce the total number of laboratory animals needed. Both lines can be investigated at the same time in the same rat, i.e. both ectopic and orthotopic implants, diminishing the number of rats needed.

Refinement: this animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under general anesthesia according to the protocol approved by the Central Animal Laboratory. At the end of surgery and post surgery, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be empathized.

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication will be given to the animals.

- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

A search on PubMed will be performed for every developed bone substitute material, to make sure there will be no duplication.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized. The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate.

An adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures. Another adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling.
To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are place intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse affect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

Its important to highlight that this surgical procedure is performed commonly by our department people and that we have used the same animal model to study several other materials during the past few years.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored.

If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe infections at the surgical site as a complication of surgery.
8. Severe decrease of motor function, causing distress.

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The expected level of discomfort is moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

After the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the femora for histological analysis.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats
Serial number	Type of animal procedure					
2	Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Bone regeneration depends on the interaction of bone tissue with the implanted bone substitute material. When the bone substitute material degrades, new bone can be formed at the implant site because of the resulting space. Complete bone regeneration is dependent on the degradation rate of the material (e.g. the speed at which the material degrades) and on the potential for new bone formation. Bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The *in vitro* liquid environment is not relatable to an *in vivo* environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies (containing mammals) are required to investigate biological performance. We intent to compare the biological performance of a well-known bone substitute material under treated compromised and healthy conditions to gain a better understanding about how diabetes mellitus and osteoporosis and the medication used as a treatment for the diseases affect bone regeneration in a rat bone defect model for non-critical size defects.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

Furthermore, expression of surface markers, gene expression and cellular behavior will be analyzed using *in vitro* culture (e.g. osteoclastic activity). The smaller the animal, the higher the metabolic rate. Therefore, the metabolic rate of the animal determines the rate and amount of new bone formation, which, in turn, dictates the relevant time points for data collection during the course of the experiment. Shorter implantation periods (i.e. faster data sampling) are required in rats because of the fast healing (Stravopoulos et al., 2015). In this study, implantation periods will be 4 and 12 weeks, which allows comparison of the bone response in healthy conditions and in conditions of disease/medication in an early phase (up to 4 weeks

in rats) and a late phase (up to 12 weeks in rats) of material degradation and bone regeneration (Alghamdi, 2013; Al-Zube, 2009; Kuchler, 2014). It is important to first evaluate material degradation in an early phase: when degradation is not occurring, there will be no resulting space for new bone formation and consequently there will be no interest in evaluating biological performance in a late phase. The intention of this study is to gain a better understanding about how diabetes and osteoporosis and the medication used as a treatment for the diseases affect bone regeneration, in comparison to bone regeneration in healthy conditions, using a legally marketed bone substitute.

References

-Alghamdi HS, van den Beucken JJ, Jansen JA. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Jun;20(6):493-505

-Al-Zube L, Breitbart EA, O'Connor JP, Parsons JR, Bradica G, Hart CE, Lin SS. *J Orthop Res*. 2009 Aug;27(8):1074-81

-Kuchler U, Keibl C, Fugl A, Schwarze UY, Tangl S, Agis H, Gruber R. *Clin Oral Implants Res*. 2015 May;26(5):485-91

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

- Induction of diabetes mellitus: diabetes mellitus will be induced by using streptozotocin and assess the condition by measuring blood glucose levels 1 week after induction (Fuegl et al., 2011). After confirmation of hyperglycemia, insulin will be given as a therapy.
- Induction of osteoporosis: osteoporotic conditions will be induced through orchidectomy and a special diet food, 6 weeks after orchidectomy (Alghamdi et al., 2014), the condition will be accessed using micro-CT scan and checking the BMD (bone mineral density). One week after bone defect surgery, an alendronate therapy will be installed.
The approach in both groups is based on previous research, in which diabetes mellitus and osteoporosis are successfully induced. Treatment is given to provide a situation as close to the situation in human patients.
- Bone defect surgery: when the compromised conditions are confirmed, a femoral bone defect is created in both femora (diminishing the number of rats needed) and filled with bone substitute material. Both femora are operated on in one surgical session. During the surgery and post surgery, the rats will receive painkillers.

- Sacrifice: the rats will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 4 or 12 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc Nijmegen and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis.

Bilateral bone defects will be created per animal (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

For determining what animal model to use in studies investigating bone implants, it is important to understand the specific bone characteristics, such as bone modeling and remodeling. Also the size of the animal must be considered to ensure that it is appropriate for the number and size of the implant chosen (Pearce et al., 2007). For rapid screening of the biological performance of the bone substitute material, a small animal is the animal model of choice. Rats are the smallest and 'lowest' animal species suitable for bone regeneration studies. Furthermore, rats are ideal models to evaluate the performance of bone substitute materials for reasons of reliability, reproducibility, and accuracy in the obtained data.

In this study there will be 3 groups:

1. Experimental group containing diabetic rats.
2. Experimental group containing osteoporotic rats. In both experimental groups the rats will be treated with the appropriate medication.
3. Control group containing healthy rats. This group is needed for comparison.

A maximum of 6 bone substitute materials will be analyzed in these groups (diabetic, osteoporotic and healthy rats). Per material a minimum of 6 rats are needed (i.e. 2 orthotopic implantation sites per rat) per implantation period. This means $6 \times 6 \times 2 = 72$ rats. A possible loss of up to 3

animals is taken into account. Therefore, 75 rats will be used in this part of the project. The number of rats in this study is based on achievement of the study objectives with the lowest number of animals per group possible. The rats will be skeletally mature Wistar rats from an EU-registered breeder. Wistar (Wister rats) is one of the most common strains used in studies for osteoporotic (orchidectomy) and diabetic (streptozotocin) induction.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat	registered breeder	75	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: no replacement by lower animals or animal free techniques is available which mimic the biologic response requested for this experiment. However, the literature on the animal models of diabetes/osteoporosis is well accessible and the experimental protocols are well described; a high level of standardization and good comparison of experimental results between groups is possible.

Reduction: a sample size calculation was performed to provide the required number of animals to be used in this study. It is important to highlight that by using both legs we are also reducing the number of animals.

Refinement:

- Diabetes model: the model chosen is the quickest and less stressful diabetic induction model for the animal.
- Osteoporotic model: we will reduce the discomfort of invasive intervention (ORX and implantation) by performing the experiment under full anesthesia. Medication for pain will be given according to the anticipated pain after the intervention.

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication will be given to the animals.
- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

A literature search conducted in PubMed showed no results for this specific procedure.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

F. Accommodation and care

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

No difference in housing, however a low calcium food pellet is used for the ORX group until the time of the second surgery (implantation procedures), whereas the other animals receive normal food. The low calcium food is needed to establish effectively the osteoporotic condition.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized. The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

After induction of diabetic/osteoporotic conditions and the femoral bone defect, the area will initially present some redness, swelling and a possible bruise may be visible. The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate. For diabetic animals loss of weight can cause an adverse effect on welfare. For the diabetic rats, also an impaired wound healing can cause an adverse effect on welfare.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures.

Another general adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling.

To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

For diabetic animals loss of weight can cause an adverse effect on welfare. For the diabetic rats, also an impaired wound healing can cause an adverse effect on welfare. This will be watched carefully by the caretakers and researchers.

A low calcium diet is given to the Orchiectomy(ORX) group, which is not expected to influence animal behavior.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are place intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse affect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The animals will be observed on a daily basis and will be weighed on the day of diabetic/osteoporotic induction and bone defect surgery. Also at day 3 and 7 postoperatively/post induction, during the recovery period. Thereafter animals will be weighed weekly until the end of the experiment. In occurrence of unexpected clinical events, that cause distress and that are difficult or impossible to treat, they will be euthanized. The specific clinical signs include:

- Diabetic animals: rapid loss of weight (15-20%), prolonged diarrhea (3 days).
 - Further general HEP can be applied.
-

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

All 3 groups are expected to present a *moderate level* of discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

After the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the femur for histological and genetic analysis.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Bone substitutes in healthy rabbits

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Bone regeneration depends on the interaction of bone tissue with the implanted bone substitute material. When the bone substitute material degrades, new bone can be formed at the implant site because of the resulting space. Complete bone regeneration is dependent on the degradation rate of the material (e.g. the speed at which the material degrades) and on the potential for new bone formation. Bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate biological performance.

Bone substitute materials will be investigated through orthotopic (i.e. in the femora of the rabbits) implantation, leading to the objective of this study: to determine the biological performance of the developed bone substitute materials.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

The metabolic rate of the animal, in this case the rabbit, determines the rate and amount of new bone formation, which, in turn, dictates the relevant time points for data collection during the course of the experiment (Stravopoulos et al., 2015). In this study, implantation periods will be 6 and 26 weeks, which allows comparison of the biological performance of the material in an early phase of material degradation and bone regeneration and on the long-term. In rabbits these are suitable implantation periods to have a reliable insight on the long-term performance of the bone substitute material (Rajesh et al., 1998; Choi et al., 2014), because 26 weeks is expected to coincide with complete material degradation and concomitant new bone formation at the implant site. It is important to first evaluate material degradation in an early phase: when degradation is not occurring, there

will be no resulting space for new bone formation and consequently there will be no interest in evaluating biological performance in a late phase. Evaluation of bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material.

References

-Rajesh KS, Mohanty M, Varma BR, Bhat KM. *Indian J Dent Res.* 1998 Apr-Jun;9(2):59-65

-Choi S, Liu IL, Yamamoto K, Honnami M, Ohba S, Echigo R, Sakai T, Igawa K, Suzuki S, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N, Mochizuki M. *J Artif Organs.* 2014 Dec;17(4):344-51

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

· Bone defect surgery: bone substitute materials will be placed orthotopic (i.e. in the femora) in healthy, skeletally mature rabbits under general anesthesia. A femoral bone defect is created in both femora (diminishing the number of rabbits needed) and filled with one CaP-based bone substitute material per femur. Both femora are operated on in one surgical session. During the surgery and post surgery, the rabbits will receive painkillers. After the procedure, the rabbits will be housed in groups according to the housing standards. The rabbits will receive a normal diet and will have no special housing restrictions.

· Sacrifice: the **rabbits** will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 6 or 26 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc, Nijmegen and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis.

Bilateral bone defects will be created per animal (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

When the developed, experimental bone substitute material is showing promising biological performance in rats, the goal is to evaluate the long-term performance of the material in terms of complete material degradation and concomitant new bone formation. A promising biological performance means: degradation of the implant material (i.e. CaP-based bone substitute material) and new bone formation at the site of the degraded implant. Evaluation by descriptive histology and quantitative histomorphometry on bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material. Of the 12 materials tested in rats, a maximum of 9 materials (including one legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) that show the most promising biological performance will be tested in rabbits. The number of 9 materials is a maximum; when a material is not showing promising biological performance in rats, this material in its current form will not be tested in rabbits.

For injecting a synthetic bone substitute material, a certain width of the defect is necessary. Consequently rabbits are the smallest animals or 'lowest animal species' suitable for injectable bone filler testing. The long-term follow-up time is based on the time point at which implantation time coincides with complete degradation of the material and new bone formation. In rabbits this is 26 weeks. Because of the difference in bone metabolic rate between smaller (rabbit) and larger animals, rabbits are more suitable for long-term follow-up testing of the performance of bone substitute materials, because the long-term follow-up time point in smaller animals will be ahead of the long-term follow-up time point in larger animals.

A maximum of 9 materials (CaP-based bone substitute materials (experimental group) and a legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) will be analyzed. Per material a minimum of 4 rabbits are needed (i.e. 2 orthotopic implantation sites per rabbit) per implantation period. This means $9 \times 4 \times 2 = 72$ rabbits. A possible loss of up to 3 animals is taken into account. Therefore, 75 rabbits will be used in this part of the project. The number of rabbits in this study is based on achievement of the study objectives with the lowest number of animals per group possible. The rabbits will be skeletally mature, female, New Zealand white rabbits. The choice of the sex of the rabbits is female. Female rabbits are preferred for housing reasons (less aggressive compared to male rabbits).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
New Zealand white rabbit	registered breeder	75	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate bone ingrowth and biological performance.

Reduction: a power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment.

All developed synthetic bone substitute materials are tested in vitro on handling properties, i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material before they will be tested in vivo.

Bilateral defects will be created (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

Refinement: this animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under general anesthesia according to the protocol approved by the Central Animal Laboratory. At the end of surgery and post surgery, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be empathized.

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication and an antibiotic drug will be given to the animals.
- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

A search on PubMed will be performed for every developed bone substitute material, to make sure there will be no duplication.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

F. Accommodation and care

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rabbits. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized.

The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the rabbits will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate. An adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the rabbits will have the least annoyance of the sutures. Another adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rabbits. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the rabbits will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse effect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

It's important to highlight that this surgical procedure is performed commonly by our department people and that we have used the same animal model to study several other materials during the past few years.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored.

If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
 2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anemia or hypovolemic shock.
 3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
 4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
 5. Decrease in body weight of more than 20%.
 6. Severe self-mutilation due to distress.
 7. Severe infections at the surgical site as a complication of surgery.
 8. Severe decrease of motor function, causing distress.
-

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The expected level of discomfort is moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

After the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the femora for histological analysis.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>4</td><td>Bone substitutes in healthy goats</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	4	Bone substitutes in healthy goats
Serial number	Type of animal procedure					
4	Bone substitutes in healthy goats					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate biological performance.

After showing promising results in the long-term follow-up study in rabbits, the most appealing bone substitute materials will be investigated in goats through orthotopic implantation in the femoral condyles and the iliac crests (bilaterally) and through filling of the sinus floor with the developed bone substitute material, leading to the objective of this study: to determine the biological performance of the developed bone substitute materials.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

In this study, the implantation period will be 12 weeks, which is a suitable implantation period for larger animals to evaluate material degradation and bone regeneration (Hoekstra et al., 2012). Evaluation of degradation of the material in an early phase is not beneficial, because degradation is already confirmed in the study with the rabbit animal model. Instead, sequential fluorochrome labeling will make it possible to visualize the dynamics of bone growth in time. Evaluation of bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material, making translation towards clinical application possible.

References

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

- Bone defect surgery: bone defects will be created and bone substitute materials will be placed orthotopic (femoral condyles, iliac crests and sinus floors) in skeletally adult goats under general anesthesia. All goats will undergo one surgical session. During surgery heart rate and the oxygen level in the blood of the goats will be monitored. During the surgery and post surgery, the goats will receive painkillers and an antibiotic drug. After the procedure, the goats will be housed according to the housing standards. Fluorochrome markers will be administered subcutaneously at 1, 3, 6 and 9 weeks post-surgery (Loozen et al., 2015; Hoekstra et al., 2012). To analyze auto-fluorescence after histological processing, one goat will be used as a control and will not receive the fluorochrome markers (Hoekstra et al., 2012).
- Sacrifice: the goats will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 12 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc, Nijmegen. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis. Multiple implantation sites will be used to decrease the amount of animals needed to obtain the project's objectives. The femoral condyle and iliac crest models allow 4 experimental bone substitute materials. The sinus floor elevation procedure will be carried out in a split mouth design, allowing direct comparison of 2 materials; the experimental bone substitute material with a legally marketed bone substitute material.

B. The animals

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

For determining what animal model to use in studies investigating bone implants, it is important to understand the specific bone characteristics, such as bone modeling and remodeling. Also the size of the animal must be considered to ensure that it is appropriate for the number and size of the implant chosen (Pearce et al., 2007). Making an increase in the size of the defects possible and providing an increase in similarity to the human bone model, goats are used to perform implantation of the most appealing synthetic bone substitute formulations orthotopically (i.e. femoral condyles, iliac crests and sinus floor elevation procedures). The goat is a suitable animal model for testing human implants and materials as they are considered to have a metabolic rate and bone-remodeling rate similar to that of humans (Anderson et al., 1999; Spaargaren, 1994). Bone healing capacity of goat bone is comparable with that of humans (Dai et al., 2005). The goat is also a suitable animal model because of the size and shape of the bones and similarity in loading properties. In rabbits this cannot be tested because of the differences in stance between the species (Pearce et al., 2007).

Of the 9 materials tested in rabbits, a maximum of 4 materials (including one legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) that show the most promising long-term performance in terms of complete implant degradation of the implant material (i.e. CaP-based bone substitute material) and new bone formation at the site of the degraded implant will be tested in goats. Evaluation by descriptive histology and quantitative histomorphometry on bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of long-term performance of the implanted CaP-based bone substitute material.

A maximum of 4 materials (CaP-based bone substitute materials (experimental group) and a legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) will be analyzed. Per material a minimum of 8 goats are needed. This means $4 \times 8 = 32$ goats. The number of goats in this study is based on achievement of the study objectives (to demonstrate a difference between the groups) with the lowest number of animals per group possible. The goats will be skeletally mature.

The same goat will be used for a bilateral sinus elevation procedure as well as for implantation in the femora and iliac crests bilaterally:

- The sinus floor elevation procedure will be carried out in a split-model design that allows direct comparison of the most appealing developed, experimental bone substitute material with a legally marketed bone substitute material. This procedure therefore only allows 2 bone substitute materials, one at each site. Each developed material should at least be tested in a sinus floor elevation procedure (i.e. similarity to the clinical situation in humans).
- The femoral condyle and iliac crest models allow 4 experimental materials. These implantation sites are used because of the possibility to

compare biological performance of the materials and bone response between implantation sites (i.e. different bones) and to diminish the number of goats needed (The goat animal model allows more materials to be tested in one goat) All materials will be implanted in one surgical session. As mentioned above, the implantation sites are chosen because of the similarity to the clinical situation in humans (i.e. sinus elevation procedures) and because of the possibility to compare biological performance of the materials and bone response between implantation sites (i.e. different bones). Other important factors to choose these implantation sites are:

- Easy accessibility of corticocancellous bone in these bones
- The femoral condyles as a constant factor (i.e. used in the rat and rabbit animal model)
- Similarity of the iliac crest bone model to the sinus floor elevation model, because of the two cortical layers of bone that enclose the corticocancellous bone.

This study will show the in vivo performance of the bone substitute materials in terms of material degradation and the formation of new bone as a last stage of pre-clinical research, in a bone model most comparable to human. When new bone formation can be demonstrated in this pre-clinical study, further clinical research can be performed to provide an off-the-shelf bone substitute material for clinical practice.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
goat	registered breeder	32	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate bone ingrowth and biological performance.

Reduction: a power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment.

All developed synthetic bone substitute materials are tested in vitro on handling properties, i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material before they will be tested in vivo. Multiple defects (i.e. split-mouth design and both femora and both iliac crests) will be created per animal to reduce the total number of laboratory animals needed.

The same goat will be used for implantation in the femora and iliac crests as well as for a sinus elevation procedure.

Refinement: this animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under general anesthesia according to the protocol approved by the Central Animal Laboratory. At the end of surgery and post surgery, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be empathized

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication and an antibiotic drug will be given to the animals.
- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

A search on PubMed will be performed for every developed bone substitute material, to make sure there will be no duplication.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the goats. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized. The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the animals will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate.

An adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the goats will have the least annoyance of the sutures. Another adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling.

To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the goats. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are place intracutaneously. This way the goats will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse affect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

Its important to highlight that this surgical procedure is performed commonly by our department people and that we have used the same animal model to study several other materials during the past few years.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored.

If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe infections at the surgical site as a complication of surgery.
8. Severe decrease of motor function, causing distress.

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The expected level of discomfort is moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

After the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the iliac crests and femora for histological analysis.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0036
2. Titel van het project: Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
3. Titel van de NTS: Botvervangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 27-03-2015
 - in vergadering besproken: 13-04-2015, 04-05-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld: nvt
 - termijnonderbrekingen van 20-04-2015 tot 23-04-2015, van 11-05-2015 tot 25-06-2015, en van 13-07-2015 tot 27-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
 - aanpassing aanvraag: 27-07-2015
 - advies aan CCD: 18-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - -1.1 Diabetes en osteoporose komen wel voor in de titel, maar worden niet genoemd in de samenvatting. De commissie verzoekt de onderzoekers dit aan te passen.
 - -3.3 De geschatte aantallen komen niet overeen met de aantallen in de Description of animal procedures. De onderzoekers worden verzocht deze aantallen in overeenstemming te brengen.
 - - De onderzoekers worden verzocht de NTS in te korten tot ongeveer 500 woorden, conform de richtlijnen van de CCD.
 - **Project Proposal:**

- - 3.1. De huidige beschrijving van de wetenschappelijke achtergrond voldoet niet aan de richtlijnen daarvoor in de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag. De commissie verzoekt u de beschrijving van de achtergrond in overeenstemming te brengen met genoemde toelichting, en meer aandacht te besteden aan de internationale stand van het onderzoek in dit vakgebied, de botgenezing in behandelde patiënten met diabetes of osteoporose, en de aanleiding tot dit onderzoek. De beschreven hoofddoelstelling volgt nu niet logischerwijs uit de beschreven wetenschappelijke achtergrond.
- -3.4.2 Waarom willen de onderzoekers de botvervangende materialen in konijnen testen? Zij schrijven zelf dat het konijn als modeldier voor de mens niet zo geschikt is, terwijl geiten dat wel zijn. Kan het onderzoek niet beperkt worden tot rat en geit?
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. De onderbouwing voor het gebruik van de voorgestelde modellen en primaire uitkomstparameters ontbreekt, en de proeven zijn niet in voldoende detail beschreven. Het is bijvoorbeeld niet duidelijk op welke tijdstippen de onderzoekers de botvorming zullen bestuderen en waarom zij voor deze tijdstippen kiezen. Verwachten de onderzoekers dat de gekozen primaire uitkomstparameters in proef 3 afwijken in de genoemde ziektemodellen en zo ja waarop is die verwachting gebaseerd? Waarom is long-term follow-up niet belangrijk in de modellen voor diabetes en osteoporose? Waarom willen de onderzoekers zoveel laesies in geiten aanbrengen? Zij worden verzocht dit onderdeel van dierproef 1-6 in overeenstemming te brengen met de beschrijving hiervan in de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag.
- - Dierproef 1-6, B. De onderbouwing van de aantallen dieren aan de hand van een globale omschrijving van de onderzoeksgroepen ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.
- -Dierproef 1 en 2, en dierproef 5 en 6. Indien hiervoor dezelfde dieren worden gebruikt, verzoekt de commissie de onderzoekers dit in één dierproef te beschrijven of duidelijker aan te geven dat het dezelfde dieren betreft (zie ook de vraag over de niet-technische samenvatting punt 3.3).
- Datum antwoord: 23-04-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**
- -1.1 Dit is aangepast in de niet technische samenvatting en blauw gemarkeerd.
- -3.3 Dit is aangepast zodanig dat de aantallen in de Description of animal procedures en in de NTS overeenkomen.
- -De NTS is sterk ingekort.
- **Project Proposal:**
- -3.1. De beschrijving van de achtergrond is in overeenstemming gebracht met de toelichting, waarbij aandacht is besteed aan de genoemde aspecten. De toegevoegde beschrijving is blauw gemarkeerd.
- -3.4.2 Konijnen zijn geschikt om defecten te creëren van een zodanige grootte, dat het botvervangende materiaal geïnjecteerd kan worden in het botdefect. Dit is niet mogelijk in de botten van ratten. Het konijn is het kleinste dier geschikt voor onderzoek naar injecteerbare botvervangende materialen. Het konijn is eveneens zeer geschikt voor onderzoek naar de lange termijn prestaties van het botvervangende materiaal (tot 26 weken, waarbij volledige

degradatie overeenkomt met deze implantatietijd) op het gebied van degradatie van het materiaal en op het gebied van ondersteuning van de ontwikkeling van nieuw bot ter plaatse. Wanneer kan worden aangetoond dat het materiaal op de lange termijn goed presteert, kan het materiaal getest worden in geiten, waarbij een betere vergelijking gemaakt kan worden met het gedrag in menselijk bot, vanwege de overeenkomsten in mechanische belasting en de overeenkomsten in botontwikkelingen en botgenezing. Vanwege het botmetabolisme van de geit, vele gelijkenissen vertonend met dat van de mens, is de geit minder geschikt dan het konijn om de prestaties van het materiaal op lange termijn te testen. Het botmetabolisme van het konijn is namelijk veel sneller dan dat van de geit, waardoor volledige vervanging van het botvervangende materiaal door bot al bij 26 weken kan worden gezien, in tegenstelling tot bij geiten.

- *Bovenstaande is opgenomen in de project proposal punt 3.4.2 en blauw gemarkeerd.*
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A *De opmerkingen zijn verwerkt en blauw gemarkeerd.*
- - Dierproef 1-6, B. *De omschrijving van de experimentele groepen is toegevoegd en blauw gemarkeerd.*
- -Dierproef 1 en 2, en dierproef 5 en 6. *Voor de dierproeven met betrekking tot ectopische en orthotopische implantatie in ratten worden dezelfde dieren gebruikt. Deze dierproeven zijn nu samengevoegd tot één dierproef. Voor de dierproeven met betrekking tot orthotopische implantatie en sinusbodemelevatie procedures worden eveneens dezelfde dieren (geiten) gebruikt. Deze dierproeven zijn eveneens samengevoegd tot één dierproef.*
-
- Datum: 11-05-2015
- Strekking van de vragen:
- **Niet-technische samenvatting:**
- 3.3 De aantallen in de niet-technische samenvatting komen nog steeds niet overeen met de aantallen zoals genoemd in de tabellen in de beschrijving van de dierproeven (een totaal van 400 ratten). De onderzoekers worden nogmaals verzocht deze aantallen in overeenstemming met elkaar te brengen.
- **Project Proposal:**
- 3.1 De onderzoekers hebben nog niet aannemelijk gemaakt dat de botgenezing in behandelde patiënten met diabetes of osteoporose onvoldoende is. Ook ontbreekt een gedegen overzicht, met referenties, van de huidige stand van zaken in het internationale onderzoek naar botvervangende materialen en een onderbouwing waarom een combinatie van bestaande materialen met juist de andere genoemden kansrijk zou zijn. De onderzoekers worden nogmaals verzocht dit aan te passen conform de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag.
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. Het is nog steeds niet duidelijk op welke tijdstippen de botvorming bestudeerd zal worden en waarom de onderzoekers voor deze tijdstippen kiezen. Ook hebben zij niet uitgelegd waarom zij de long-term follow-up niet bestuderen in de modellen voor diabetes en osteoporose. De aantallen dieren zijn nog steeds niet voldoende onderbouwd aan de hand van een experimenteel design. Ook is nog steeds niet toegelicht

waarom de onderzoekers zoveel laesies in geiten willen aanbrengen. Zij worden nogmaals verzocht deze informatie toe te voegen.

- -Dierproef 1-6, B. De aantallen dieren in de tabel komen niet overeen met de aantallen dieren in de tekst.
- Datum antwoord: 23-04-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**
- *3.3 Reactie: de aantallen zijn aangepast zodat deze door de gehele projectaanvraag eensluidend zijn. Het gaat hierbij om in totaal 225 ratten, waarvan 75 ratten voor onderzoek naar de invloed van diabetes/osteoporose op botgenezing bij gebruik van botvervangend materiaal en 150 ratten voor onderzoek naar de prestaties van nieuw ontwikkeld, experimenteel botvervangend materiaal in gezonde condities. Voorts omvat de projectaanvraag 100 konijnen en 32 geiten voor evaluatie van botregeneratie in alternatieve diermodellen.*
- **Project Proposal:**
- *3.1 Reactie: de achtergrond informatie (3.1) is aangepast en de aanpassingen zijn blauw gemarkeerd, waarbij middels referenties het feit dat botgenezing in patiënten met diabetes of osteoporose afwijkend is, wordt onderbouwd. Tevens is de huidige stand van zaken in (internationaal) onderzoek naar botvervangende materialen toegevoegd, waaruit blijkt dat door de combinatie van geïjkt biomateriaal voor botvervangende materialen (i.e. calciumfosfaat) met snel degraderende componenten (zgn. porogens o.b.v. bijvoorbeeld polymeren) doeltreffend is voor de optimalisatie van botregeneratie.*
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. *Reactie: de tijdstippen waarop de botvorming bestudeerd zal worden, zijn voor elk specifiek projectonderdeel toegevoegd in de beschrijving van de dierproeven alsook waarom voor deze tijdstippen gekozen is. Voorts zijn de aantallen dieren onderbouwd en is toegelicht wat het doel van de experimenten met geiten is.*
- -Dierproef 1-6, B. *Reactie: de aantallen dieren in de tabel en tekst zijn aangepast zodat zij overeenkomen.*
-
- Datum: 13-07-2015
- Strekking van de vragen:
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP3, onderdeel A tweede vraag: In de laatste zin is sprake van ratten terwijl konijnen bedoeld worden. De onderzoekers worden verzocht dit te corrigeren.
- -DAP 1,3 en 4, onderdeel B: De onderzoekers willen alle 12 materialen die getest worden in ratten, daarna ook testen in konijnen. Is het niet de bedoeling dat in de sequentie rat>konijn>geit steeds een selectie van de beste materialen plaatsvindt? Dit wordt wel gesuggereerd onder 3.4.3 van het Project proposal. De onderzoekers worden verzocht een selectie te maken en aan te geven op grond waarvan zij materialen selecteren voor deze dierproef, of aannemelijk te maken dat alle botvervangende materialen in konijnen getest dienen te worden.
- Datum antwoord: 27-07-2015
- Strekking van de antwoorden:

- **Description of Animal Procedures:**
 - -DAP3, onderdeel A tweede vraag: *Reactie: bovenstaande is gecorrigeerd.*
 - -DAP 1,3 en 4, onderdeel B: *Reactie: een selectie van de beste materialen is toegevoegd en tevens is aangegeven op grond waarvan de materialen geselecteerd worden voor de dierproeven. De tekst waarin dit beschreven wordt is vetgedrukt.*
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions)'. Grote botdefecten genezen vaak niet spontaan. Het defect dient dan te worden "opgevuld" om te zorgen dat het bot weer herstelt of aan elkaar groeit. Het verkrijgen van goede synthetische botvervangende materialen die voor dit doel kunnen worden gebruikt is van belang, omdat zij het gebruik van allogeen bot of autoloog bot voor de behandeling van botdefecten kunnen voorkomen. Zowel het gebruik van donorbot, als het gebruik van eigen bot van de patiënt heeft belangrijke nadelen. Voor het gebruik van botmateriaal van de patiënt zelf is bijvoorbeeld een belastende operatie nodig (in feite wordt dan elders in het lichaam een botdefect gecreëerd). Voor synthetische botvervangende materialen is het van belang dat ze biocompatibel zijn, met de juiste snelheid worden afgebroken en tegelijk de vorming van nieuw eigen bot stimuleren. Dit project zal duidelijk maken of het nieuw ontwikkelde botvervangende materiaal een verbetering ten opzichte van het huidige synthetische botvervangende materiaal op basis van CaP laat zien voor wat betreft gecontroleerde degradatie en stimulatie van botvorming bij ratten, konijnen en geiten. De experimenten zullen een indicatie geven of dit nieuwe materiaal ook een verbetering zal betekenen op deze gebieden wanneer het wordt gebruikt bij patiënten met osteoporose of diabetes bij wie het botvormingsproces minder goed verloopt als gevolg van hun ziekte.

Bovendien wordt een indruk verkregen van de lange termijn effecten van toepassing van dit materiaal. Een dergelijk synthetisch botvervangend materiaal zou gebruikt kunnen worden bij patiënten met botdefecten in tanden, kaken, ruggenwervels en het bewegingsapparaat. Het beschikbaar komen van verbeterde materialen vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn wetenschappelijk verantwoord en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De proeven in de verschillende diersoorten volgen logisch op elkaar en geven antwoorden op verschillende typen vragen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken welke factoren van een verbeterd synthetisch botvervangend materiaal op basis van CaP belangrijk zijn voor de gewenste biocompatibiliteit, degradatiesnelheid en botvorming, en welk effect de toevoeging van antibiotica en bioorganische stoffen op deze parameters heeft. Het onderzoek geeft een indicatie van de mogelijkheid om dit materiaal toe te passen bij de behandeling van botdefecten bij mensen met diabetes of osteoporose.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen en opvullen van een aantal botdefecten, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. Bij een aantal dieren zal bovendien osteoporose of diabetes worden geïnduceerd, waarna ze adequate behandeling hiervan zullen ontvangen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde botoperaties en orchidectomie in als matig, en de behandeling van osteoporose en de inductie en behandeling van diabetes als licht. Het cumulatief ongerief voor het beschreven project is daarom terecht ingeschat als matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd, voor de resterende onderzoeksvragen is onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Er worden een aantal botdefecten per proefdier aangebracht om het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. Op grond van de resultaten bij ratten worden een aantal materialen getest in konijnen. Alvorens experimenten met geiten plaatsvinden zal weer een selectie gemaakt worden van te testen materialen op grond van de resultaten bij konijnen. De volgorde van de experimenten en de noodzaak om in alle drie de diersoorten experimenten te verrichten, is goed beargumenteerd. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 225 ratten, 75 konijnen en 32 geiten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie, en adequate behandeling van diabetes en osteoporose. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de vraag hoe de samenstelling en structuur van synthetisch botvervangend materiaal op basis van CaP, en de toevoeging van antibiotica en bioinorganische stoffen daaraan, eigenschappen als biocompatibiliteit, degradatiesnelheid en botvorming beïnvloeden. De resultaten geven onder andere een indicatie of deze materialen ook met succes kunnen worden toegepast voor de behandeling van botdefecten bij mensen met diabetes of osteoporose. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een verbeterd synthetisch botvervangend materiaal. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel, gezien de toename van het aantal ouderen in onze maatschappij en de nadelen van het nu beschikbare materiaal voor met name patiënten met osteoporose en diabetes.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aanbrengen en opvullen van botdefecten en in sommige gevallen het induceren en behandelen van diabetes of osteoporose. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

██████████
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN
██████████

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015227

Bijlagen

2

Datum 27-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015227. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

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: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein-Noord 9
Postbus: 91025
Postcode en plaats: 6525 EZ NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: PhD student
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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: 25 september 2015
Geplande einddatum: 25 september 2020
Titel project: Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
Titel niet-technische samenvatting: Botvangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 25 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015227

Bijlagen

2

Datum 27-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 27 augustus 2015

Vervaldatum: 26 september 2015

Factuurnummer: 201570227

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015227	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 6 oktober 2015 17:12
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD103002015227

Beste [REDACTED]

Hierbij de antwoorden van de onderzoekster m.b.t. dit project.

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Geachte mevrouw [REDACTED]

Hierbij doe ik u de antwoorden op de vragen toekomen m.b.t. projectvoorstel AVD103002015227 getiteld: "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes":

1. In de experimentele opzet beschrijft u dat de te testen bone substitutes simultaan in gezonde ratten en in ratten met een ziektemodel getest worden (bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2). Uit uw beschrijving maken wij op dat alleen die bot vervangende middelen getest worden in konijnen en geiten wanneer die in beide rattenmodellen veelbelovende resultaten geven. Kunt u bevestigen of dit de juiste interpretatie is?

Antwoord vraag 1: deze interpretatie is grotendeels juist. Wanneer de te testen botvervangende materialen in gezonde ratten veelbelovende resultaten geven, zullen deze botvervangende materialen verder getest worden in gezonde konijnen en geiten. Alleen die botvervangende materialen die een goed resultaat geven in gezonde ratten zullen verder worden getest in gezonde konijnen en geiten.

In de ratten met een ziektemodel wordt de invloed van de ziekte getest op de biologische prestatie van botvervangend materiaal. Het botvervangend materiaal wordt niet getest in konijnen of geiten met een ziektemodel. Met andere woorden: voor het ziektemodel worden slechts ratten gebruikt.

2. In de bijlages beschrijving dierproeven geeft u alleen in bijlage 3.4.4.3 aan dat u vrouwelijke konijnen wilt inzetten. Kunt u voor de ratten en geiten uit de andere bijlages ook aangeven welk geslacht dieren u wilt inzetten en als u de voorkeur heeft voor 1 geslacht kunt u dit dan toelichten?

Antwoord vraag 2: alle ratten die worden ingezet zijn mannelijk. Mannelijke ratten hebben het voordeel substantieel grotere femur te hebben dan vrouwelijke ratten wat noodzakelijk is voor het creëren van de gewenste botdefecten in de femora (Alghamdi H.S., Tissue Engineering Part C Methods, 2013) Alle geiten die worden ingezet zijn vrouwelijk. Geiten komen van een gangbare boerderij waar zij worden ingezet voor melkproductie. Wanneer zij niet toereikend zijn voor melkproductie (te lage melkproductie) worden zij ingezet in dierexperimenteel onderzoek. Grote hoeveelheden bokken worden niet gehouden op een boerderij, aangezien zij geen melk produceren.

Hartelijk dank voor het in behandeling nemen van ons projectvoorstel,

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: maandag 5 oktober 2015 16:20
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD103002015227

Geachte [REDACTED]

Wij hebben nog geen antwoord ontvangen op onderstaande vragen. Het kan zijn dat u deze mail niet heeft ontvangen omdat wij op dit moment wat technische problemen met de mail. Wij zien uw antwoord graag tegemoet,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

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

Van: Info-zbo

Verzonden: donderdag 1 oktober 2015 13:40

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: vraag bij de behandeling van AVD103002015227

Geachte [REDACTED]

Bij de behandeling van uw projectvoorstel AVD103002015227 getiteld: "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" hebben wij nog de volgende vragen:

In de experimentele opzet beschrijft u dat de te testen bone substitutes simultaan in gezonde ratten en in ratten met een ziektemodel getest worden (bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2). Uit uw beschrijving maken wij op dat alleen die bot vervangende middelen getest worden in konijnen en geiten wanneer die in beide rattenmodellen veelbelovende resultaten geven. Kunt u bevestigen of dit de juiste interpretatie is?

In de bijlages beschrijving dierproeven geeft u alleen in bijlage 3.4.4.3 aan dat u vrouwelijke konijnen wilt inzetten. Kunt u voor de ratten en geiten uit de andere bijlages ook aangeven welk geslacht dieren u wilt inzetten en als u de voorkeur heeft voor 1 geslacht kunt u dit dan toelichten?

U kunt deze vragen per mail beantwoorden,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

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

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227

Uw referentie

Bijlagen
1

14 OKT. 2015

Datum
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte mevrouw [REDACTED]

Op 25 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" met aanvraagnummer AVD103002015227. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 oktober 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld na vragen van de CCD of u de keuze voor mannelijk of vrouwelijke dieren nader kon motiveren.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De tweede voorwaarde is een algemene voorwaarde die wordt gesteld bij projecten met een 5-jarige looptijd, om te voldoen aan datgene wat voortvloeit uit artikel 10 van de wet. U kunt met uw project "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 oktober 2015 tot en met 25 september 2020. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

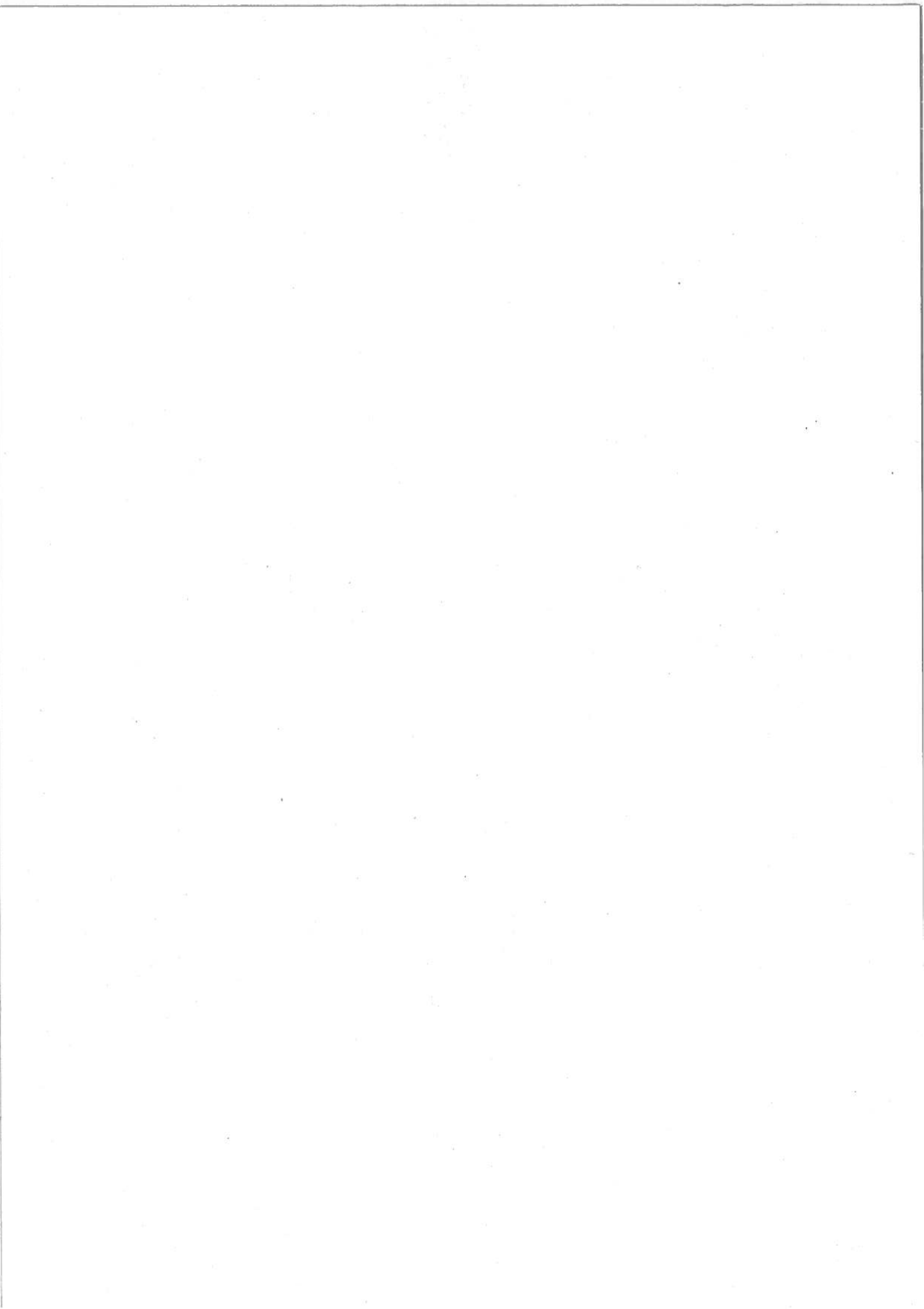
Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. De CCD stelt aanvullend een paar algemene voorwaarden.

Bezwaar

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

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



Datum
14 oktober 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227

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

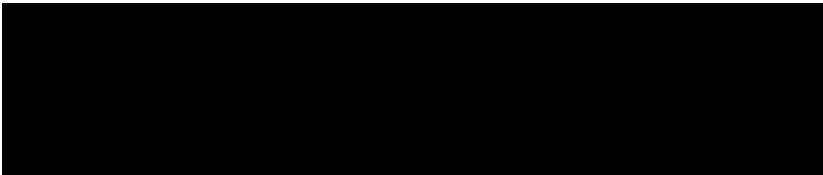
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



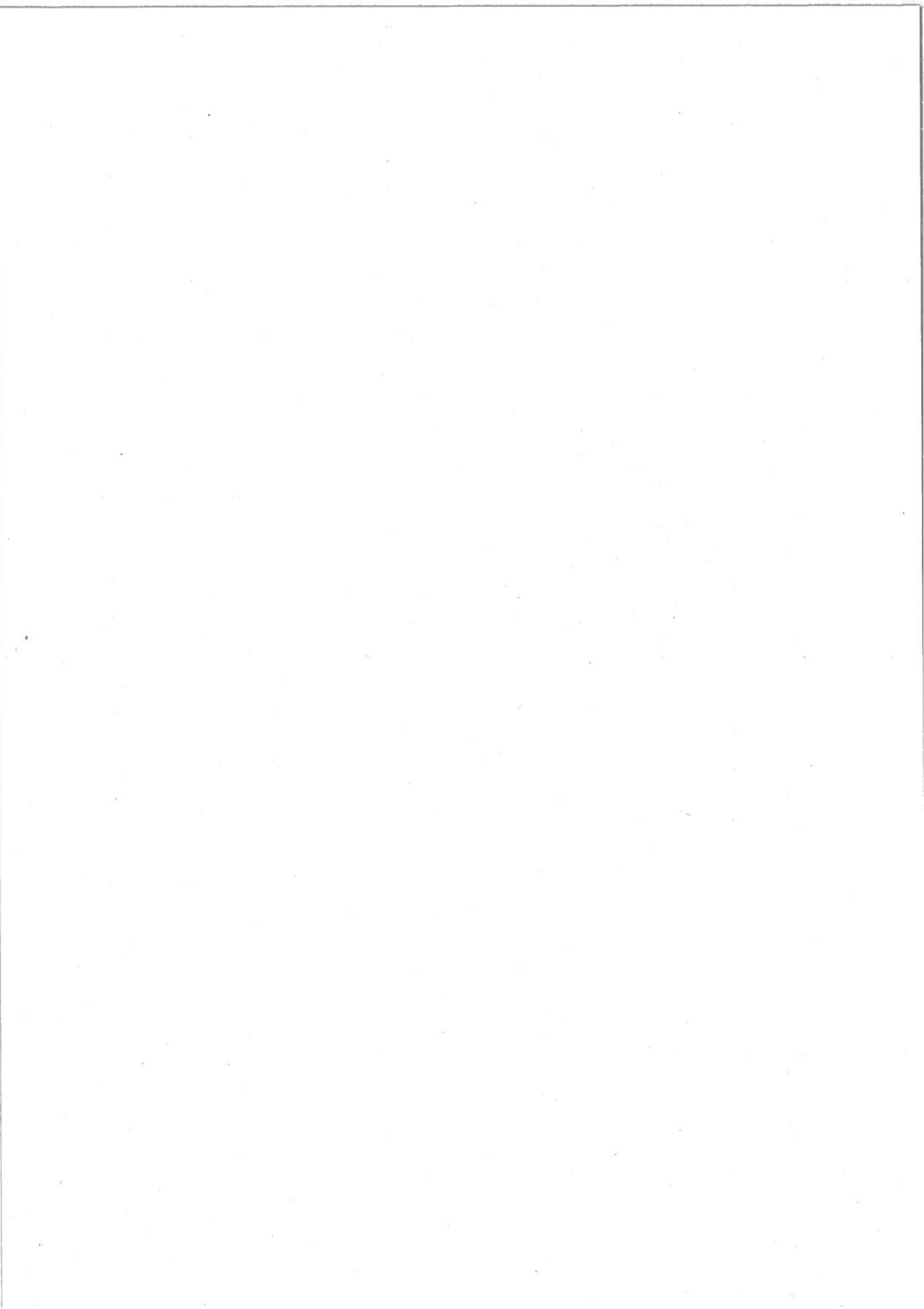
Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

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





Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: postbus 91025
Postcode en woonplaats: 6525 EZ Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 oktober 2015 tot en met 25 september 2020, voor het project "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" met aanvraagnummer AVD103002015227, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker in opleiding. Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op dd 18 augustus 2015, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6 oktober 2015.

Dierproeven

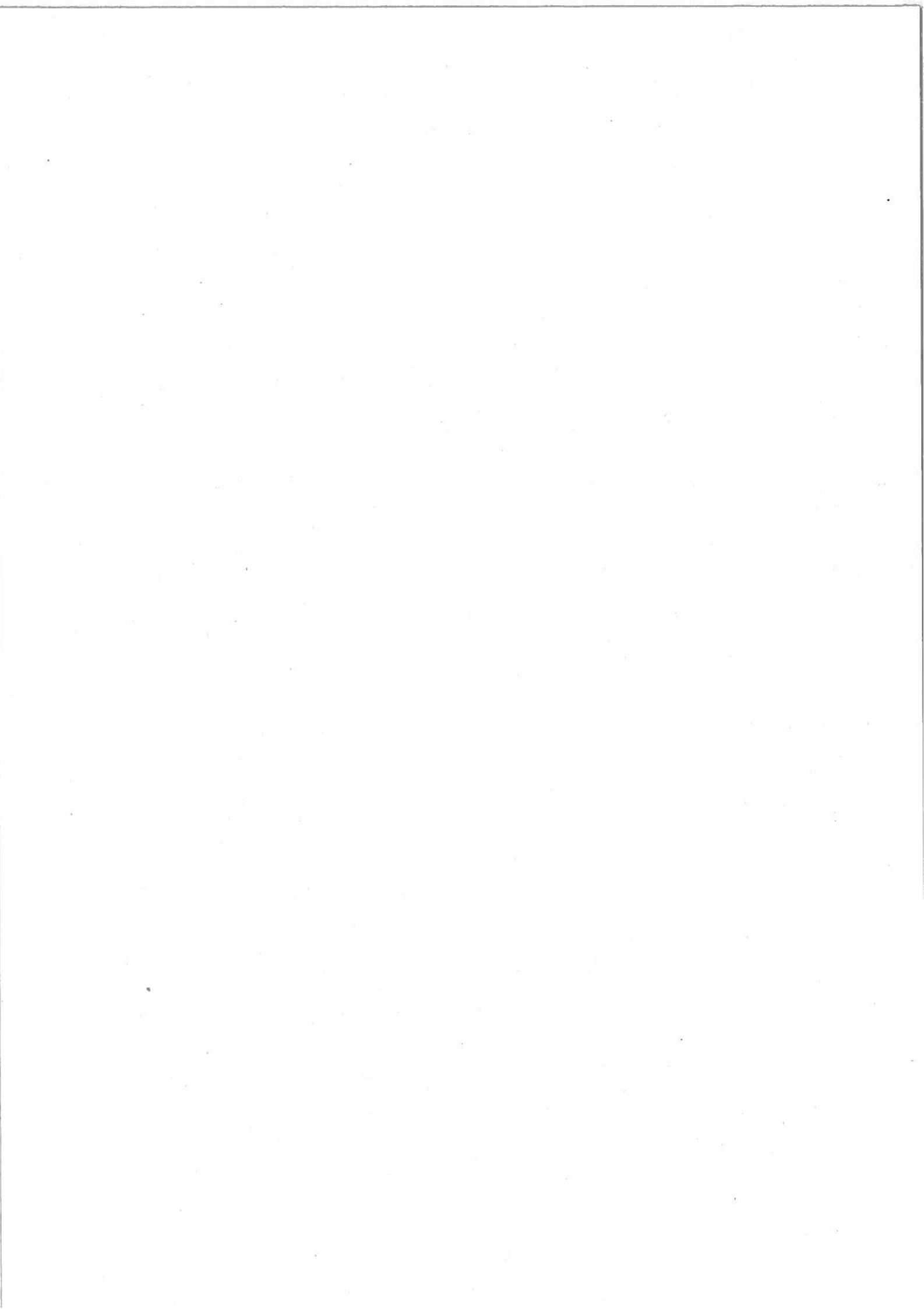
Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Bone substitutes in healthy rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar	150	Matig / moderate
Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar	75	Matig / moderate
Bone substitutes in healthy rabbits	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / New Zealand White	75	Matig / moderate
Bone substitutes in healthy goats	Geiten (<i>Capra aegagrus hircus</i>) / niet benoemd	32	Matig / moderate

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

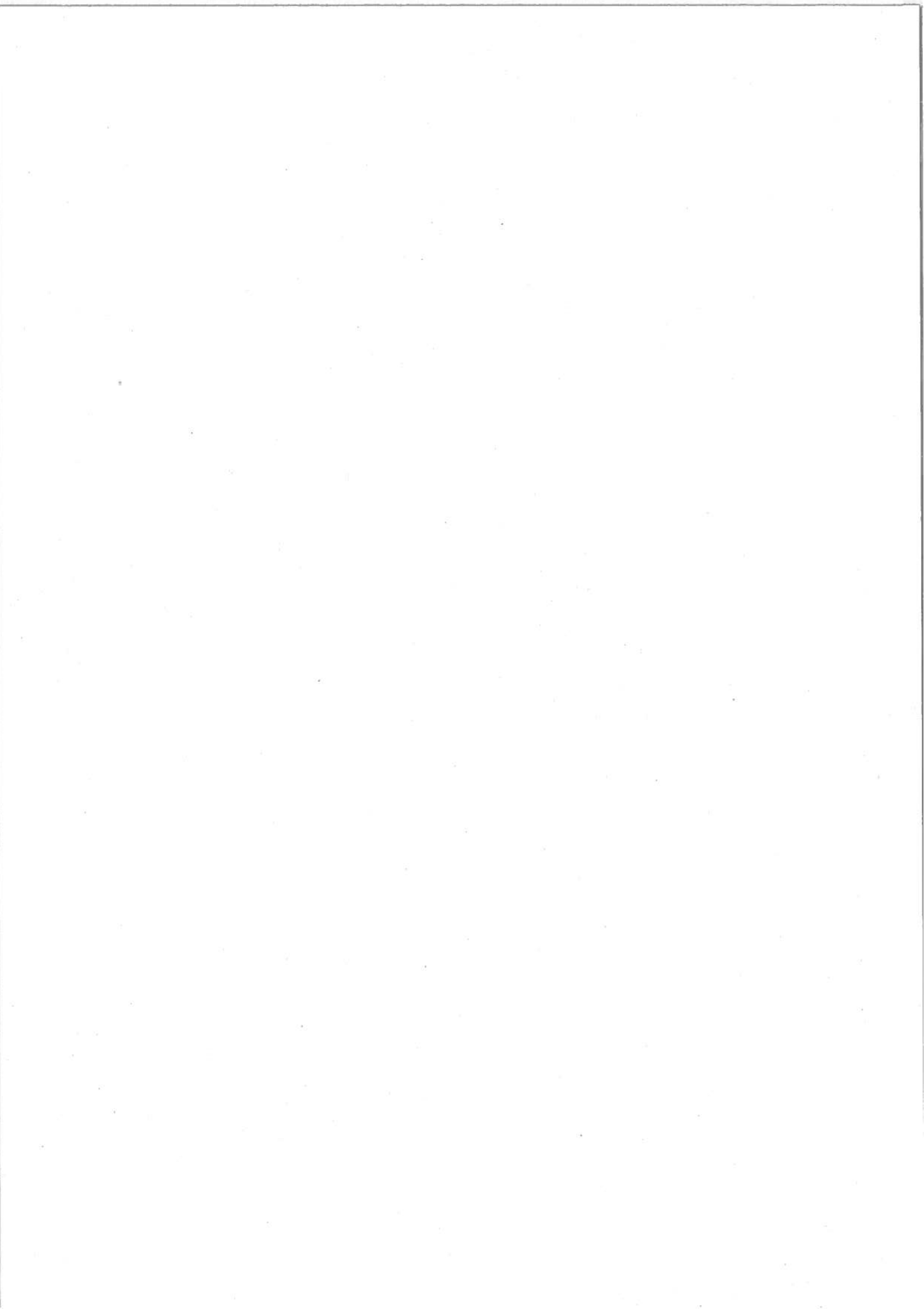
De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat beslissingen over go/no go momenten worden genomen met instemming van de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te



Datum
14 oktober 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227

melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.



Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

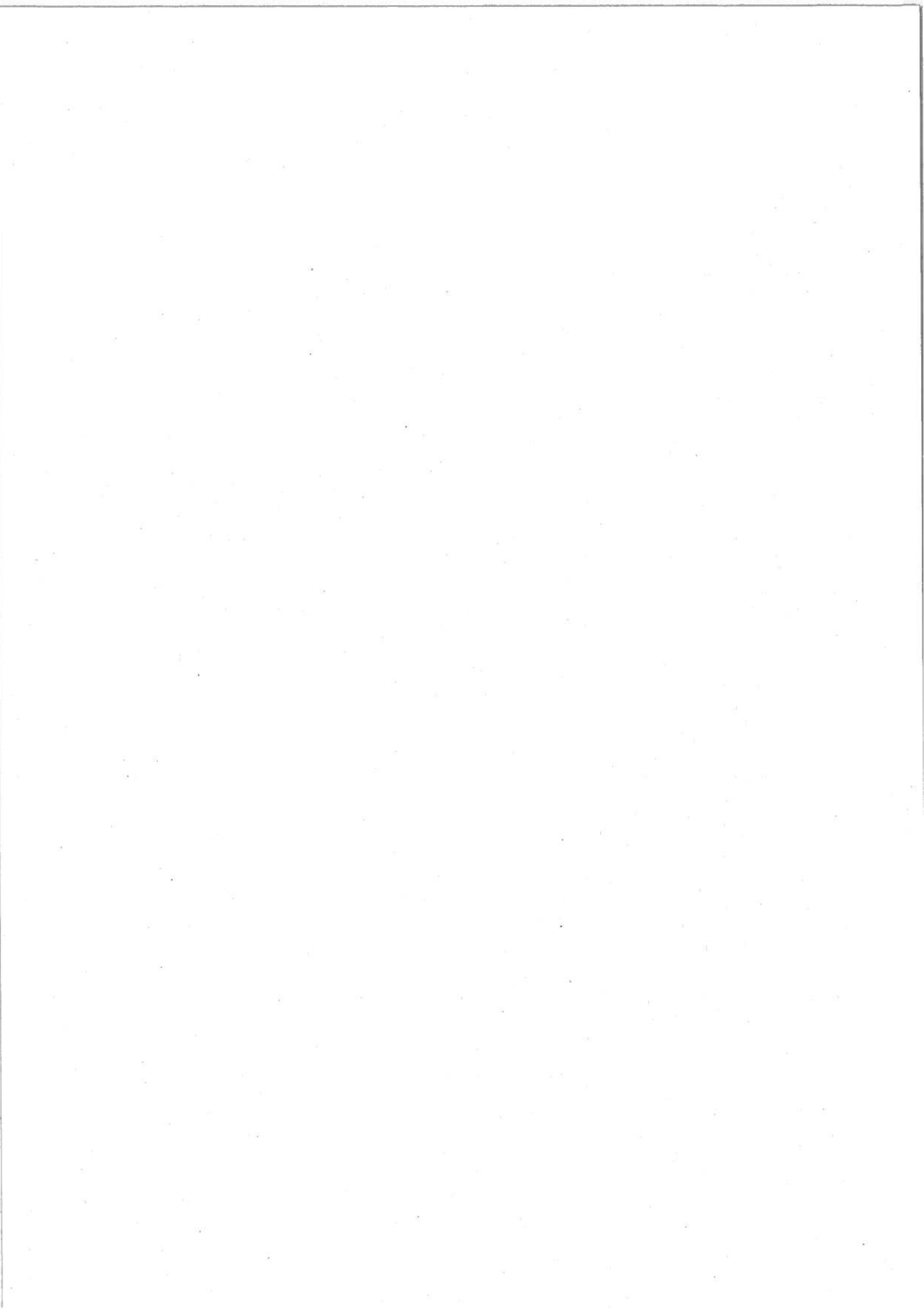
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

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



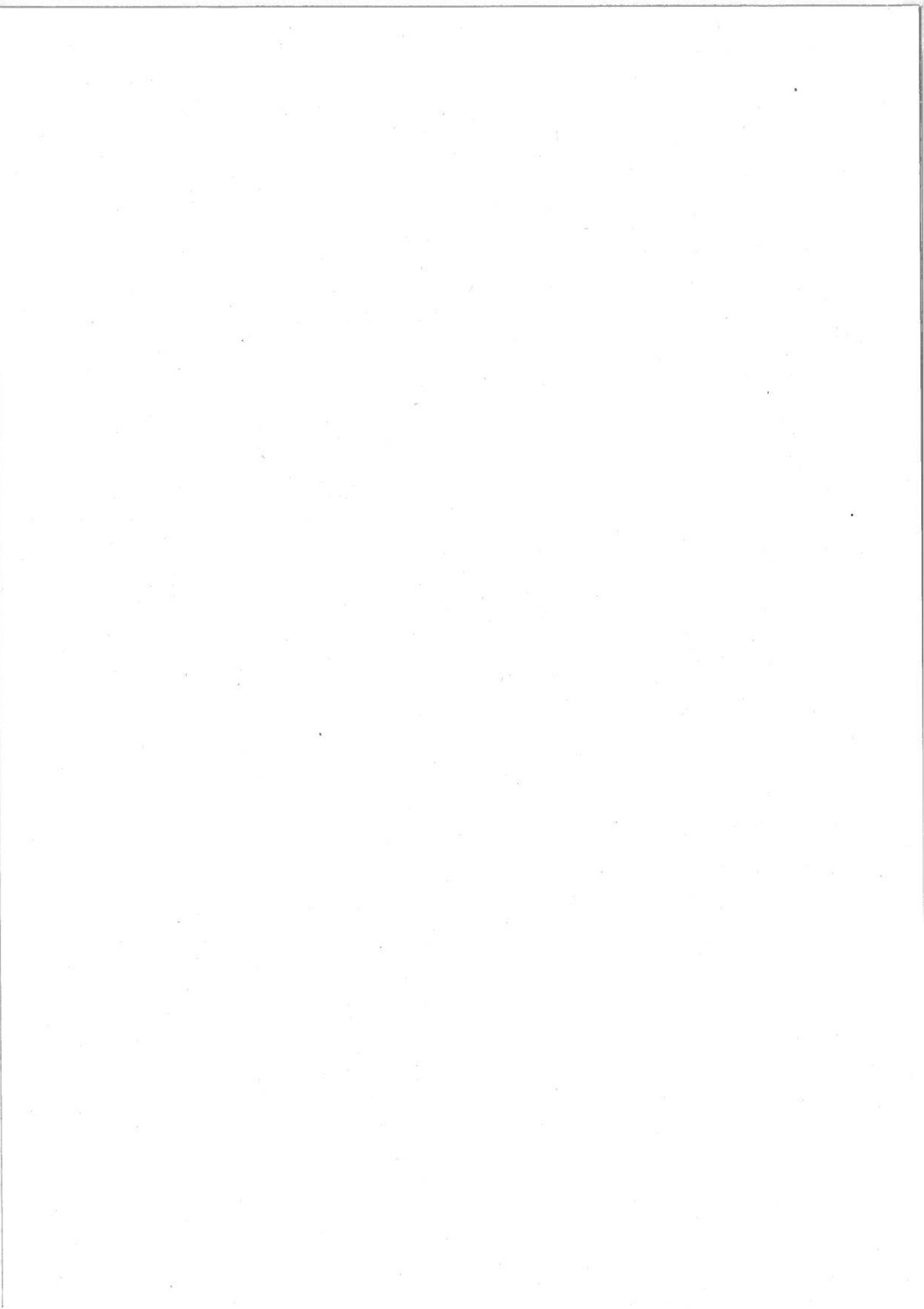
Datum
14 oktober 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c 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 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.



DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0036
2. Titel van het project: Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
3. Titel van de NTS: Botvervangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 27-03-2015
 - in vergadering besproken: 13-04-2015, 04-05-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld: nvt
 - termijnonderbrekingen van 20-04-2015 tot 23-04-2015, van 11-05-2015 tot 25-06-2015, en van 13-07-2015 tot 27-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
 - aanpassing aanvraag: 27-07-2015
 - advies aan CCD: 18-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - -1.1 Diabetes en osteoporose komen wel voor in de titel, maar worden niet genoemd in de samenvatting. De commissie verzoekt de onderzoekers dit aan te passen.
 - -3.3 De geschatte aantallen komen niet overeen met de aantallen in de Description of animal procedures. De onderzoekers worden verzocht deze aantallen in overeenstemming te brengen.
 - - De onderzoekers worden verzocht de NTS in te korten tot ongeveer 500 woorden, conform de richtlijnen van de CCD.
 - **Project Proposal:**

- - 3.1. De huidige beschrijving van de wetenschappelijke achtergrond voldoet niet aan de richtlijnen daarvoor in de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag. De commissie verzoekt u de beschrijving van de achtergrond in overeenstemming te brengen met genoemde toelichting, en meer aandacht te besteden aan de internationale stand van het onderzoek in dit vakgebied, de botgenezing in behandelde patiënten met diabetes of osteoporose, en de aanleiding tot dit onderzoek. De beschreven hoofddoelstelling volgt nu niet logischerwijs uit de beschreven wetenschappelijke achtergrond.
- -3.4.2 Waarom willen de onderzoekers de botvervangende materialen in konijnen testen? Zij schrijven zelf dat het konijn als modeldier voor de mens niet zo geschikt is, terwijl geiten dat wel zijn. Kan het onderzoek niet beperkt worden tot rat en geit?
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. De onderbouwing voor het gebruik van de voorgestelde modellen en primaire uitkomstparameters ontbreekt, en de proeven zijn niet in voldoende detail beschreven. Het is bijvoorbeeld niet duidelijk op welke tijdstippen de onderzoekers de botvorming zullen bestuderen en waarom zij voor deze tijdstippen kiezen. Verwachten de onderzoekers dat de gekozen primaire uitkomstparameters in proef 3 afwijken in de genoemde ziektemodellen en zo ja waarop is die verwachting gebaseerd? Waarom is long-term follow-up niet belangrijk in de modellen voor diabetes en osteoporose? Waarom willen de onderzoekers zoveel laesies in geiten aanbrengen? Zij worden verzocht dit onderdeel van dierproef 1-6 in overeenstemming te brengen met de beschrijving hiervan in de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag.
- - Dierproef 1-6, B. De onderbouwing van de aantallen dieren aan de hand van een globale omschrijving van de onderzoeksgroepen ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.
- -Dierproef 1 en 2, en dierproef 5 en 6. Indien hiervoor dezelfde dieren worden gebruikt, verzoekt de commissie de onderzoekers dit in één dierproef te beschrijven of duidelijker aan te geven dat het dezelfde dieren betreft (zie ook de vraag over de niet-technische samenvatting punt 3.3).
- Datum antwoord: 23-04-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**
- -1.1 *Dit is aangepast in de niet technische samenvatting en blauw gemarkeerd.*
- -3.3 *Dit is aangepast zodanig dat de aantallen in de Description of animal procedures en in de NTS overeenkomen.*
- -De NTS is sterk ingekort.
- **Project Proposal:**
- -3.1. *De beschrijving van de achtergrond is in overeenstemming gebracht met de toelichting, waarbij aandacht is besteed aan de genoemde aspecten. De toegevoegde beschrijving is blauw gemarkeerd.*
- -3.4.2 *Konijnen zijn geschikt om defecten te creëren van een zodanige grootte, dat het botvervangende materiaal geïnjecteerd kan worden in het botdefect. Dit is niet mogelijk in de botten van ratten. Het konijn is het kleinste dier geschikt voor onderzoek naar injecteerbare botvervangende materialen. Het konijn is eveneens zeer geschikt voor onderzoek naar de lange termijn prestaties van het botvervangende materiaal (tot 26 weken, waarbij volledige*

degradatie overeenkomt met deze implantatietijd) op het gebied van degradatie van het materiaal en op het gebied van ondersteuning van de ontwikkeling van nieuw bot ter plaatse. Wanneer kan worden aangetoond dat het materiaal op de lange termijn goed presteert, kan het materiaal getest worden in geiten, waarbij een betere vergelijking gemaakt kan worden met het gedrag in menselijk bot, vanwege de overeenkomsten in mechanische belasting en de overeenkomsten in botontwikkelingen en botgenezing. Vanwege het botmetabolisme van de geit, vele gelijkenissen vertonend met dat van de mens, is de geit minder geschikt dan het konijn om de prestaties van het materiaal op lange termijn te testen. Het botmetabolisme van het konijn is namelijk veel sneller dan dat van de geit, waardoor volledige vervanging van het botvervangende materiaal door bot al bij 26 weken kan worden gezien, in tegenstelling tot bij geiten.

- *Bovenstaande is opgenomen in de project proposal punt 3.4.2 en blauw gemarkeerd.*
- **Description of Animal Procedures:**
- *- Dierproef 1-6, A De opmerkingen zijn verwerkt en blauw gemarkeerd.*
- *- Dierproef 1-6, B. De omschrijving van de experimentele groepen is toegevoegd en blauw gemarkeerd.*
- *-Dierproef 1 en 2, en dierproef 5 en 6. Voor de dierproeven met betrekking tot ectopische en orthotopische implantatie in ratten worden dezelfde dieren gebruikt. Deze dierproeven zijn nu samengevoegd tot één dierproef. Voor de dierproeven met betrekking tot orthotopische implantatie en sinusbodemelevatie procedures worden eveneens dezelfde dieren (geiten) gebruikt. Deze dierproeven zijn eveneens samengevoegd tot één dierproef.*
-
- Datum: 11-05-2015
- Strekking van de vragen:
- **Niet-technische samenvatting:**
- 3.3 De aantallen in de niet-technische samenvatting komen nog steeds niet overeen met de aantallen zoals genoemd in de tabellen in de beschrijving van de dierproeven (een totaal van 400 ratten). De onderzoekers worden nogmaals verzocht deze aantallen in overeenstemming met elkaar te brengen.
- **Project Proposal:**
- 3.1 De onderzoekers hebben nog niet aannemelijk gemaakt dat de botgenezing in behandelde patiënten met diabetes of osteoporose onvoldoende is. Ook ontbreekt een gedegen overzicht, met referenties, van de huidige stand van zaken in het internationale onderzoek naar botvervangende materialen en een onderbouwing waarom een combinatie van bestaande materialen met juist de andere genoemde kansrijk zou zijn. De onderzoekers worden nogmaals verzocht dit aan te passen conform de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag.
- **Description of Animal Procedures:**
- *- Dierproef 1-6, A. Het is nog steeds niet duidelijk op welke tijdstippen de botvorming bestudeerd zal worden en waarom de onderzoekers voor deze tijdstippen kiezen. Ook hebben zij niet uitgelegd waarom zij de long-term follow-up niet bestuderen in de modellen voor diabetes en osteoporose. De aantallen dieren zijn nog steeds niet voldoende onderbouwd aan de hand van een experimenteel design. Ook is nog steeds niet toegelicht*

waarom de onderzoekers zoveel laesies in geiten willen aanbrengen. Zij worden nogmaals verzocht deze informatie toe te voegen.

- -Dierproef 1-6, B. De aantallen dieren in de tabel komen niet overeen met de aantallen dieren in de tekst.
- Datum antwoord: 23-04-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**
- *3.3 Reactie: de aantallen zijn aangepast zodat deze door de gehele projectaanvraag eensluidend zijn. Het gaat hierbij om in totaal 225 ratten, waarvan 75 ratten voor onderzoek naar de invloed van diabetes/osteoporose op botgenezing bij gebruik van botvervangend materiaal en 150 ratten voor onderzoek naar de prestaties van nieuw ontwikkeld, experimenteel botvervangend materiaal in gezonde condities. Voorts omvat de projectaanvraag 100 konijnen en 32 geiten voor evaluatie van botregeneratie in alternatieve diermodellen.*
- **Project Proposal:**
- *3.1 Reactie: de achtergrond informatie (3.1) is aangepast en de aanpassingen zijn blauw gemarkeerd, waarbij middels referenties het feit dat botgenezing in patiënten met diabetes of osteoporose afwijkend is, wordt onderbouwd. Tevens is de huidige stand van zaken in (internationaal) onderzoek naar botvervangende materialen toegevoegd, waaruit blijkt dat door de combinatie van geijkt biomateriaal voor botvervangning (i.e. calciumfosfaat) met snel degraderende componenten (zgn. porogens o.b.v. bijvoorbeeld polymeren) doeltreffend is voor de optimalisatie van botregeneratie.*
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. *Reactie: de tijdstippen waarop de botvorming bestudeerd zal worden, zijn voor elk specifiek projectonderdeel toegevoegd in de beschrijving van de dierproeven alsook waarom voor deze tijdstippen gekozen is. Voorts zijn de aantallen dieren onderbouwd en is toegelicht wat het doel van de experimenten met geiten is.*
- -Dierproef 1-6, B. *Reactie: de aantallen dieren in de tabel en tekst zijn aangepast zodat zij overeenkomen.*
-
- Datum: 13-07-2015
- Strekking van de vragen:
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP3, onderdeel A tweede vraag: In de laatste zin is sprake van ratten terwijl konijnen bedoeld worden. De onderzoekers worden verzocht dit te corrigeren.
- -DAP 1,3 en 4, onderdeel B: De onderzoekers willen alle 12 materialen die getest worden in ratten, daarna ook testen in konijnen. Is het niet de bedoeling dat in de sequentie rat>konijn>geit steeds een selectie van de beste materialen plaatsvindt? Dit wordt wel gesuggereerd onder 3.4.3 van het Project proposal. De onderzoekers worden verzocht een selectie te maken en aan te geven op grond waarvan zij materialen selecteren voor deze dierproef, of aannemelijk te maken dat alle botvervangende materialen in konijnen getest dienen te worden.
- Datum antwoord: 27-07-2015
- Strekking van de antwoorden:

- **Description of Animal Procedures:**
 - -DAP3, onderdeel A tweede vraag: *Reactie: bovenstaande is gecorrigeerd.*
 - -DAP 1,3 en 4, onderdeel B: *Reactie: een selectie van de beste materialen is toegevoegd en tevens is aangegeven op grond waarvan de materialen geselecteerd worden voor de dierproeven. De tekst waarin dit beschreven wordt is vetgedrukt.*
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions)'. Grote botdefecten genezen vaak niet spontaan. Het defect dient dan te worden "opgevuld" om te zorgen dat het bot weer herstelt of aan elkaar groeit. Het verkrijgen van goede synthetische botvervangende materialen die voor dit doel kunnen worden gebruikt is van belang, omdat zij het gebruik van allogeen bot of autoloog bot voor de behandeling van botdefecten kunnen voorkomen. Zowel het gebruik van donorbot, als het gebruik van eigen bot van de patiënt heeft belangrijke nadelen. Voor het gebruik van botmateriaal van de patiënt zelf is bijvoorbeeld een belastende operatie nodig (in feite wordt dan elders in het lichaam een botdefect gecreëerd). Voor synthetische botvervangende materialen is het van belang dat ze biocompatibel zijn, met de juiste snelheid worden afgebroken en tegelijk de vorming van nieuw eigen bot stimuleren. Dit project zal duidelijk maken of het nieuw ontwikkelde botvervangende materiaal een verbetering ten opzichte van het huidige synthetische botvervangende materiaal op basis van CaP laat zien voor wat betreft gecontroleerde degradatie en stimulatie van botvorming bij ratten, konijnen en geiten. De experimenten zullen een indicatie geven of dit nieuwe materiaal ook een verbetering zal betekenen op deze gebieden wanneer het wordt gebruikt bij patiënten met osteoporose of diabetes bij wie het botvormingsproces minder goed verloopt als gevolg van hun ziekte.

Bovendien wordt een indruk verkregen van de lange termijn effecten van toepassing van dit materiaal. Een dergelijk synthetisch botvervangend materiaal zou gebruikt kunnen worden bij patiënten met botdefecten in tanden, kaken, ruggenwervels en het bewegingsapparaat. Het beschikbaar komen van verbeterde materialen vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn wetenschappelijk verantwoord en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De proeven in de verschillende diersoorten volgen logisch op elkaar en geven antwoorden op verschillende typen vragen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken welke factoren van een verbeterd synthetisch botvervangend materiaal op basis van CaP belangrijk zijn voor de gewenste biocompatibiliteit, degradatiesnelheid en botvorming, en welk effect de toevoeging van antibiotica en bioorganische stoffen op deze parameters heeft. Het onderzoek geeft een indicatie van de mogelijkheid om dit materiaal toe te passen bij de behandeling van botdefecten bij mensen met diabetes of osteoporose.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen en opvullen van een aantal botdefecten, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. Bij een aantal dieren zal bovendien osteoporose of diabetes worden geïnduceerd, waarna ze adequate behandeling hiervan zullen ontvangen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde botoperaties en orchidectomie in als matig, en de behandeling van osteoporose en de inductie en behandeling van diabetes als licht. Het cumulatief ongerief voor het beschreven project is daarom terecht ingeschat als matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De onderdelen van het project die in vitro uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd, voor de resterende onderzoeksvragen is onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Er worden een aantal botdefecten per proefdier aangebracht om het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. Op grond van de resultaten bij ratten worden een aantal materialen getest in konijnen. Alvorens experimenten met geiten plaatsvinden zal weer een selectie gemaakt worden van te testen materialen op grond van de resultaten bij konijnen. De volgorde van de experimenten en de noodzaak om in alle drie de diersoorten experimenten te verrichten, is goed beargumenteerd. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 225 ratten, 75 konijnen en 32 geiten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie, en adequate behandeling van diabetes en osteoporose. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

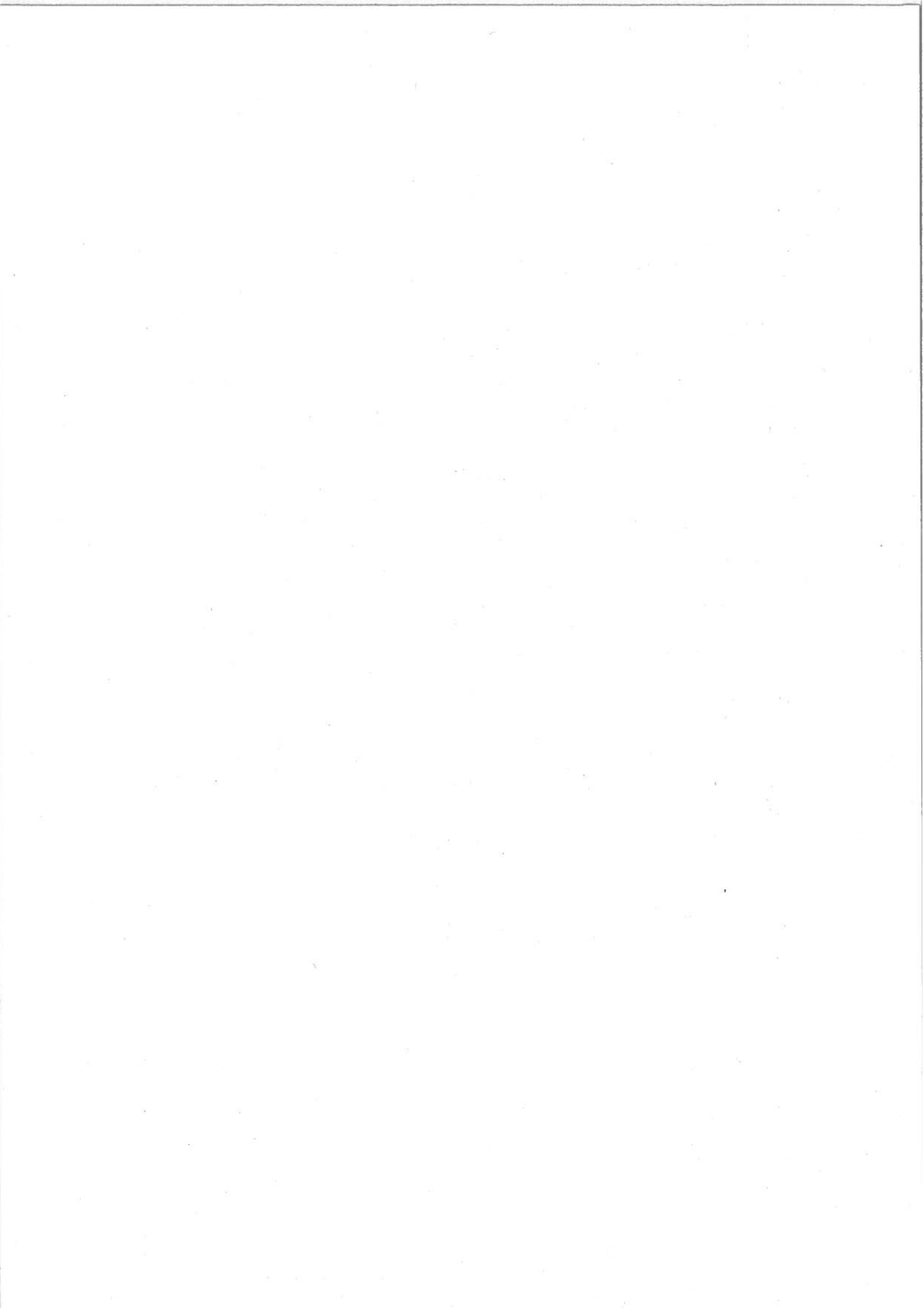
Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de vraag hoe de samenstelling en structuur van synthetisch botvervangend materiaal op basis van CaP, en de toevoeging van antibiotica en bioorganische stoffen daaraan, eigenschappen als biocompatibiliteit, degradatiesnelheid en botvorming beïnvloeden. De resultaten geven onder andere een indicatie of deze materialen ook met succes kunnen worden toegepast voor de behandeling van botdefecten bij mensen met diabetes of osteoporose. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een verbeterd synthetisch botvervangend materiaal. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel, gezien de toename van het aantal ouderen in onze maatschappij en de nadelen van het nu beschikbare materiaal voor met name patiënten met osteoporose en diabetes.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aanbrengen en opvullen van botdefecten en in sommige gevallen het induceren en behandelen van diabetes of osteoporose. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



[Redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 14 oktober 2015 14:32
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: Beschikking AVD103002015227
Bijlagen: Beschikking 227.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze beschikking is ook per post verstuurd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

[Redacted]

.....
[Redacted] Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015229								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Mail vragen en antwoorden 8-9-2015				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	



27 AUG. 2015

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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td></tr> <tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr> <tr><td>KvK-nummer</td><td>4 1 0 5 5 6 2 9</td></tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Geert Groteplein 10</td></tr> <tr><td>Postbus</td><td>9101</td></tr> <tr><td>Postcode en plaats</td><td>6500HB Nijmegen</td></tr> <tr><td>IBAN</td><td>NL90ABNA0231209983</td></tr> <tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>UMC St Radboud</td></tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10	Postbus	9101	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10																
Postbus	9101																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>PhD student</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	PhD student		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	PhD student																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 2 4 . 0 9 . 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 . 1 1 . 2 0 1 7
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Imaging in hard tissue eneneering
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Beeldvorming in harde tissue engineering
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 468,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 25 - 08 - 2015

Handtekening [REDACTED]



**Form
Project proposal**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Imaging in hard tissue engineering

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures <input type="checkbox"/> Higher education or training
-----	---	---

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

Despite its static aspect, bone is a highly dynamic tissue that undergoes continuous remodeling through osteoclast-mediated erosion activity, versus osteoblast-mediated deposition of new bone. This same process is the reason behind the high regenerative capacity of bone in the healing pathway after a bone fracture. Nevertheless in case of critical size defects, for instance after a tumor resection, bone regeneration is not adequate to achieve complete recovery. In such cases usually a surgical intervention with placement of a graft material is needed. One common treatment for such cases is obtaining autograft bone from an easily accessible site in the body (often from the iliac crest) and the subsequent transplantation of such autologous bone into the defect region. However, the low supply of transplantable bone, the necessity of additional surgery, and the high morbidity at the donor site, incited the scientific community to look for valid alternatives to the bone autograft. Specifically, the development of biocompatible and biodegradable bone substitutes, have opened new frontiers in what nowadays is known as *hard tissue engineering* (hTE) [1].

Among all the commercially available bone substitutes, calcium phosphate cement (CPC) is widely used because of its optimal biological properties. The material resembles natural bone and as such has excellent biocompatibility, and guides new bone formation (osteoconductivity). Furthermore, the injectability of CPC makes this biomaterial useful especially for minimally invasive surgical operations. In that way the material can be injected into places without large surgical intervention, can be applied in locations which are difficult to reach, and after hardening will fit optimally into the defect area [2].

CPC materials are considered as a valid alternative to bone autograft and have found several clinical applications as bone substitute, especially in craniofacial applications, as a bonefiller in osteonecrotic lesions, and as reinforcement for cancellous osteoporotic bone around orthopaedic implants [3,4,5]. Additionally CPCs are widely used as fillers in several dental applications, to accelerate healing process and or provide augmentation around dental implants, and in periodontal pockets [6].

Once implanted in the body, the biomaterial needs to be identified and visualized in order to evaluate the outcome of the surgical procedure. Furthermore the material needs to be followed over the time in order to confirm integration and degradation ratio, and consequently to evaluate the new bone formation, which will end up with a complete bone recovery. Nowadays an increasing number of technologies are used in order to diagnose bone fractures, infections and cancers, such as X-ray, Computer Tomography (CT) and Magnetic Resonance Imaging (MRI) [7]. Moreover, new imaging technologies (e.g. Ultrasound (US), Positron Emission Tomography (PET), Single Photon Emission Computer Tomography (SPECT), Optical Imaging (OI), Photoacoustic Imaging (PI), which so far were mainly used for soft tissues, are finding application also in hard tissues. Also the

combination of these techniques has been investigated in order to obtain more comprehensive and robust information than any single imaging approach. The most commonly used multimodality technologies are, for instance, MRI/CT, PET/CT, MRI/US, SPECT/CT and PET/OI [8]. However, few studies have been performed in order to evaluate the applicability of imaging modalities in hTE, where a potential implanted material needs to be followed longitudinally. Specifically, when CPC is chosen as a bone substitute, several issues can be found because of the high similarity with the natural osseous phase. For instance, due to the high content of calcium salts, CPC has similar radiopacity to bone in conventional X-ray techniques, which means that CPCs are naturally not, or at least not clearly visible on radiographs [7]. In previous studies performed in our laboratory

With this project we want to investigate the possibility to use innovative contrast agents into CPC material, in order to develop an advanced biodegradable material for hard tissue applications (e.g. in bone or teeth), that can be either clearly visualized once implanted in the body and followed over the time. A multimodal imaging approach will be pursued in order to get high sensitivity and high spatial resolution images of the implanted material. It is intended to image the implanted material over the entire time of the (osteoclast mediated) material degradation, and the subsequent (osteoblast mediated) new bone formation. To study whether the imaging indeed is congruent with these phases, we intend to experiment by adding specific growth factors (e.g. RANKL and BMP-2) aimed to modulate the processes of degradation and bone formation.

Therefore we expect that the development of this new biomaterial together with a multimodal imaging approach can allow a better understanding of the material integration and degradation *in vivo*. This does not only enhance the applicability of the current CPC material but will also be facilitating future biomaterial development for hard tissue engineering applications.

This project is

References

1. Stevens M.M., Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*. 2008 May; 11(5):18-25.
2. Low K.L., Tan S.H., Zein S.H., Roether J.A., Mouriño V., Boccaccini A.R., Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Jul; 94(1):273-86.
3. Sariibrahimoglu, K., et al., Injectable biphasic calcium phosphate cements as a potential bone substitute. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014. 102(3): p. 415-22.
4. Ambard, A.J. and L. Mueninghoff, Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties. *J Prosthodont*, 2006. 15(5): p. 321-8.
5. Larsson, S., et al., Injectable calcium phosphate cement for augmentation around cancellous bone screws. *In vivo biomechanical studies*. *J Biomech*, 2012. 45(7): p. 1156-60.
6. Xie, C., et al., The use of calcium phosphate-based biomaterials in implant dentistry. *J Mater Sci Mater Med*, 2012. 23(3): p. 853-62.
7. Griffith, J.F. and H.K. Genant, New imaging modalities in bone. *Curr Rheumatol Rep*, 2011. 13(3): p. 241-50.

[REDACTED]

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The aim of this project is to develop a biodegradable material for hard tissue engineering (e.g. bone and teeth) which can be longitudinally imaged with high spatial resolution using different multimodal imaging approaches.

During the last years, in our department [REDACTED], we achieved ample expertise in the field of bone substitutes, especially about calcium phosphate-based materials. Several CPC compositions have already been developed in our laboratory, and the most successful composition has currently been submitted for CE approval. With the advent of new tissue engineering technologies we enlarged our knowledge in the field of the imaging of bone and bone substitutes. This was possible also thanks to the advanced imaging technologies specifically available at the [REDACTED]. Moreover, we already investigated and pursued the possibility to use contrast agents in order to enhance the contrast between the CPC composition and the natural bone phase [1,2]. For such reasons, we believe that we have all the necessary expertise and facilities to successful achieve the main goal of our project.

References

[REDACTED]

3.3 Relevance

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

Biocompatible and biodegradable biomaterials are necessary as a scaffold for cellular ingrowth, to enhance new tissue regeneration. An ideal combination between non-invasive imaging modality and biomaterial is a prerequisite in hard tissue engineering, especially when multiple scans are needed which can expose the body to high doses of contrast agents or radiation. Multimodal imaging modalities are becoming an useful strategy in order to obtain more detailed functional and anatomical information for a more specific patient diagnosis.

In this context, the development of an innovative biodegradable bone substitute, which can be detected clearly through radiation free technologies (e.g. MRI), would perfectly fit for any hard tissue application. The use of that material can facilitate a better understanding of the implant integration

in the body which eventually can be useful not only for the improvement in material development, but also for a deeper understanding of the pathway behind the processes of material degradation and the new bone formation. All such information can be used in hTE in order to develop materials that can enhance natural bone regeneration and can lead to a faster healing process after a surgical procedure. Furthermore a material that is longitudinally detectable will be an optimal tool for surgeons and dentists who want to evaluate the outcomes of an implant procedure and follow the healing process of the patient over time. This can bring several advantages in term of patient monitoring and health care service, for example the possibility to rapidly identify abnormalities, infections and micro-cracks in the implant material.

3.4 Research Strategy

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

Magnetic resonance will be used as primary imaging technique because it is a radiation free methodology. In combination with MRI other imaging modalities, such as μ CT, US, PET, SPECT, OI and PI will be chosen in accordance with a specific contrast agent.

In order to reach the goals of this project our first step (*in vitro* and *ex vivo* experiments) are already completed. A defined CPC composition, already known for its mechanical, degradable and biological properties, was combined with specific biocompatible contrast agents without altering the initial CPC mechanical and biological features. The mechanical and biological properties were checked and validated by *in vitro* experiments (material characterization, mechanical testing, degradation test, cell culture). Once the material was obtained and validated *in vitro*, also *ex vivo* studies were recently performed. Animal bones and teeth were collected from cadavers of animals already used in other experiments (re-use). Through these tests we could optimize the visibility properties of the material required for an optimal imaging in the actual tissue (e.g. determine the right amount and achieve equal distribution of contrast agent). Furthermore this new developed composition was verified to exhibit better imaging properties when compared to the previously developed composition () and does not show any drawbacks, such as the aforementioned blooming effect. The shape of the implanted material can be easily recognized which is an huge improvement compared with the previous composition where the implant could only be localized.

Now that *in vitro* and *ex vivo* studies are performed, animal experiments are requested in order to evaluate the material integration and degradation over the time. For the *in vivo* tests, only the composition is chosen which gave the best performance in terms of mechanical and biological properties and the best outcomes in terms of detectability, quality of the image, intensity of the signal and resolution. Through the *in vivo* study the visibility of the material will be assessed over a specific time that concurs with the material degradation and the consequent new bone formation, which are processes that can not be studied outside of the living organism. This is justified by the fact that the complexity of the pathway behind the material degradation and the new bone formation is not reproducible in an *in vitro* system.

After the implantation *in vivo* (in a surgically created condyle defect) the animals will be scanned at only two specific time points (i.e. according to our previous studies these time points will be 4 weeks and 8 weeks;) and the detectability of the implant will be evaluated. Finally, at the end of the experimental time, the animal will be sacrificed and the femora will be processed for histology in order to evaluate new bone formation.

Once the material is successfully tested *in vivo*, in a new experiment the material with contrast agent will be associated to a specific slow release carrier for growth factors . It is already known that these factors will result in a modulation of the bone healing process.

█ In this way, we will be able to prove that our imaging results are indeed longitudinally detectable and quantification of the signal can be directly correlated to the degradation of the material and subsequent ingrowth of bone.

Considering that a) the duration of each experiment will be approximately 8 months (including material preparation, in vivo experiment, data collection and analysis), b) in the unlucky case of inconveniences we can have some delay, and c) the machines at the PRIME facility are used also by several others operators and therefore they are frequently engaged, we estimate that the project will have to be performed in a step wise manner over a total period of approximately 25 months (i.e. November 2017).

[REDACTED]

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

We will test the new compositions in a small animal model (i.e. Wistar rats), as are most commonly used for bone implants [1, 2, 3, 4]. Bone remodeling will be evaluated by means of the material implantation in the condyle. For this purpose, a cylindrical defect of 3mm in depth and 3 mm in diameter will be surgically created. After implantation the material, degradation will be checked at time points of 4 and 8 weeks, which is based on our previous studies [REDACTED]. Two or more different imaging modalities will be used to detect the material according to the specific contrast agent used (i.e. MRI, CT, US, PI, SPECT, PET and OI).References

1. Muschler G.F., Raut V.P., Patterson T.E., Wenke J.C., Hollinger J.O., *The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine*. Tissue Eng Part B Rev. 2010 Feb;16(1):123-45.
2. American Society for testing and Materials, www.astm.org
3. International organization for Standardization, www.iso.org
4. European Commission, <http://ec.europa.eu>

[REDACTED]

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

In this project an innovative material composition will be investigated. The material consists of a bone substitute component (always CPC) combined with a specifically designed contrast agent [REDACTED]. The experimental groups will consist of CPC with and without contrast agent. The differences in visualization capacity between the treated (CPC with contrast agent) and control (CPC without contrast agent) groups will be qualitatively and quantitatively evaluated.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	rat condyle defeact

Appendix**Description animal procedures**

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure rat condyle defeact

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The CPC composition is combined with different contrast agents ([REDACTED]) by using specific carriers (e.g. microparticles, microcylinders) or chemical reactions. In that way we aim to develop an improved bone substitute that can be clearly and longitudinally visualized once implanted in the body. High resolution and improved imaging quality can give more anatomical and functional information compared with the standard CPC compositions. This will be useful for a better understanding of the process behind the material degradation and the new bone formation, which is critically important for new materials development.

Furthermore, less invasive imaging techniques can overcome the problems related to the prolonged exposition to radiation.

The ability to detect the bone substitute *in vivo* will be evaluated by scanning the implanted material *in situ* using different imaging modalities in accordance with the specific contrast agent (i.e. MRI, CT, SPET, PET, US and PI). Therefore the quality of the image and the resolution that can be obtained will be assessed by comparing images qualitatively, and doing quantitative measurements on image quality.

In order to evaluate the ability to follow the material degradation over the time, the implant will be checked *in situ* with the same imaging techniques at two different time points (e.g. 4 weeks and 8 weeks). This time points were chosen according to external literature as well as to our own previous studies where similar CPCs were evaluated.

Histological analysis will be performed in order to evaluate the new bone formation, in comparison to the images obtained.

[REDACTED]
[REDACTED] Manipulating the healing process with these factors is used to validate the assumption that the data obtained from imaging is indeed in line with the biological responses.

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

Defects will be created in the condyle of the rat under general anesthesia. Afterwards the CPC compositions will be injected in the defect and subsequently the subcutaneous tissue and the skin will be closed by sutures. The animals will be anesthetized again at two specific time points (e.g. 4 and 8 weeks post-surgery) in order to perform the imaging scans. At the end of the experimental procedure the animals will be sacrificed and the tissues will be harvested and processed for histology.

A defined calcium phosphate cement (CPC) is chosen as bone filler. [REDACTED]

[REDACTED] To this basic cement composition, contrast agents (CA) will be added.

Firstly, [REDACTED]

After these different compositions will be tested *in vivo*, the outcomes will be compared and the material that will give the best performance in terms of detectability, quality of the images, intensity of the signal, resolution and amount of information achievable about degradation of the material and the new bone formation, will be chosen for further *in vivo* investigation: The CPC/contrast agent will be augmented with a slow release carrier for specific factors [REDACTED]. These factors have a very different effect ([REDACTED]) but taken together in this context (i.e. hard Tissue Engineering) they can induce a faster bone healing.

The experimental procedure consists in different steps:

- Administration of a complete regimen of analgesics and antibiotics.
- Anesthetization of the animals.
- Exposure of the knee joint after a longitudinal parapatellar incision.
- Preparation of a small cylindrical defect in the condyle (3 x 3 mm).
- Injection of the material and closure by suturing.
- Careful monitoring of uneventful wound healing
- Follow-up of the material: at two time points (e.g. 4 and 8 weeks) the defect will be imaged by two/three different imaging modalities under general anesthesia.
- At the end the animal will be euthanized and the femura will be harvested for further histological investigation.

Defect in rat condyle is a well know procedure which is often used to test the biocompatibility of several implantable biomaterials (e.g. metal, ceramics, cements). The femora are easily accessible bone , and only the defect in condyle allows for an enough amount of material to be injected, which can be compared at same time with both cortical and trabecular bone phases. Furthermore this procedure was usually used in previous studies performed in our laboratory. Using the same model we can acquire all the needed expertise to perform this procedure reducing the risk of animal loss or implant failure.

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

The samples size determination for the *in vivo* rat study is calculated in line with the requirements of the [REDACTED], [REDACTED], and based on the existing literature and the experience of our research group.

In order to define the sample size a power calculation will be performed and the animals will randomly assigned to each group using a computerized random generator (www.random.org).

In order to reduce the number of animals, extensive *in vitro* studies have already been accomplished and used to choose the material which give the best performance in terms of detectability, quality of the image, signal intensity and resolution. We also increased the number of implant per animal as much as possible (i.e. using both legs).

B. The animals

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

Healthy adult male Wistar rats (about 6 weeks old) are chosen as animal model to study our bone substitutes. Based on our previous studies we estimate to use 12 animals for group which means that we need a total of 120 animals for this project. Animals will be purchased from a registered Dutch breeding company.

[REDACTED]

The rat femur is an easily accessible place and the bone is big enough in order to perform cylindrical defects (3x3 mm) which can be injected with a sufficient amount of material. Bilateral defect will be made, however, it is not possible to create the same defect size in other bones (such as the tibia).

Wistar rats are chosen as animal model because they are largely used especially to evaluate the performance of bone substitutes materials and because they can give ideal results in terms of reliability, reproducibility and accuracy. Rats are considered an optimal model especially for primary screenings *in vivo*. Furthermore rats are more ethically accepted compared with other animal models (e.g. dog, sheep and goat). Considering that, *a.* we will use both femora for each rat, *b.* we will have different experimental groups (see the list below), *c.* based on our previous studies *d.* there are two timepoints and *e.* we do not foresee loss of animal exceeding one group size ; we foresee , the maximal number of rats needed is 120.

List of the experimental groups:

[REDACTED]

References

[REDACTED]

6. American Society for testing and Materials, www.astm.org
 7. International organization for Standardization, www.iso.org
 8. European Commission, <http://ec.europa.eu>

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Wistar rat	registered breeder	120	20 weeks maximum

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

REPLACEMENT. Degradation of-, and new bone formation around a material, can only take place in an animal model in which the material can be

implanted. The determining factors such as a normal circulatory system, movement, wound healing, growth of the bone cells, etc, are such complex processes that they cannot be completely and reliably be reproduced outside of the body system.

MRI scanners that exist for preclinical imaging research can only be used for the mouse or rat. However, the mouse is too small to be able to make a critical (i.e. not spontaneously healing) bone defect. Therefore the animal model selected for the experiments is rat. Rats are the most commonly used animal model in which the materials can be studied, with a high degree of reliability and reproducibility. Rats are considered an optimal model for primary screening *in vivo*. Furthermore rats are more ethically accepted compared with other animal models (i.e. dog, sheep and goats).

REDUCTION. In order to reduce the number of animals a significant effort has been put in testing the new materials in tissues *ex vivo*, in pieces of cadaver bone obtained from dead animals. After the pre-screening tests only the compositions that gave the best performance in terms of detectability, quality of the image, signal intensity and resolution were chosen for the *in vivo* studies. In this way the number of materials to be used *in vivo* is reduced as much as we could.

For all samples size calculation, a power analysis was performed in order to provide the required number of animals to be used.

Additionally we chose to increase the number of implants for each animal as much as we could (i.e. using both legs of the rat) according with the common standard for experimental animal model procedures.

REFINEMENT. The surgical procedure will be performed by expert operators under general anesthesia and antibiotic regimen in order to reduce the pain and other adverse symptoms like infections.

Anesthesia and analgesia protocols are followed as specified in the guidelines of the [REDACTED]. If necessary the experiments will be supplemented in accordance with advice from veterinarians, animal welfare officers, and biotechnicians. The animals will be housed under standard conditions in groups. Animals will be weighed and monitored regularly to avoid unexpected symptoms that can result in animal loss, or alterations of the outcomes.

According with our experience no further discomfort for the animals are expected with exception of the anesthesia and analgesia.

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

In order to reduce the stress during the experimental time the animals will be housed in group.

Animals will be observed daily and weighted every week. In the unlucky case of occurrence of unexpected clinical events, that can cause distress or that are difficult to treat, the animals will be euthanized according to the standard procedure (humane endpoint) used for each animal species by the [REDACTED]

Repetition and Duplication

E. Repetition

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

N/A

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

In order to reduce the pain in the animals painkiller will be used according with the expertise of the veterinarians and the biotechnicians of [REDACTED].

Thanks to our expertise and previous studies in this field we already defined an optimized protocol for the implant of materials in condyle defect in rat animal models. Following that protocol the the pain in the animals is reduced as much as we could.

Furthermore the surgical procedure will be performed only by expert operators.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

According to ours previous *in vivo* studies no others adverse effects on the animal welfare are expected. Historically all our animals did non show any problems related to limping, restriction in movement or wound opening. All the animals recover after few hours postsurgery.

The only adverse effects expected are related to the use of anesthesia and analgesia (e.g. suffocation, cessation breathing, hypotermia, tachycardia, arrhythmias, moderate hypotension).

Explain why these effects may emerge.

Cause of adverse effects are related to the use of anesthesia and analgesia (e.g. suffocation, cessation breathing, hypotermia, tachycardia, arrhythmias, moderate hypotension).

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

After the surgical procedure the animals are constantly monitored until they are conscious again and show stable vital signs.

Later on the animals will be observed daily for any signs of surgical complications (i.e. infection, wound opening) and weighted every week.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Prolonged weekly loss of weight (more than 15-20%), wound infection or opening, prolonged diarrhea (>3 days) and general humane endpoints (e.g. severe bleeding, laboured breathing, etc).

Indicate the likely incidence.

The incidence of humane endpoint is very low (< 5%).
Historically we have not had animal loss or unexpected complications.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The only discomfort forecasted is related to the anesthesia and to the euthanasia injections.
Both surgical procedures can cause a low blood pressure and decrease in respiratory function. The probability for these discomforts is around 100%, therefore we estimate a MODERATE degree of discomfort within the first day after surgery.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

L. Method of killing

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The animals will be sacrificed at the end of the experimental time. This is necessary in order to harvest the tissues that are needed for histological analysis.

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0035
2. Titel van het project: Imaging in hard tissue engineering.
3. Titel van de NTS: Beeldvorming in harde tissue engineering.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 22-05-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-06-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-06-2015 tot 25-06-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 25-06-2015
 - advies aan CCD: 24-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-06-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Er staan nog veel taalfouten in deze aanvraag. Wij adviseren u de tekst van deze projectaanvraag nogmaals goed na te kijken met meer aandacht voor het verbeteren van formuleringen (o.a. enkel- of meervoudsvormen, tegenwoordige of verleden tijd), grammatica en spelfouten, en hierbij het vier-ogen-principe toe te passen.
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - De woordkeus in onderdeel 3.1 is nog onvoldoende afgestemd op de doelgroep. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.
 - **Project Proposal:**
 - De titel bevat een spelfout.

-3.1. Uit de gegeven achtergrond wordt onvoldoende duidelijk wel kennishaat de onderzoekers willen vullen met de resultaten van dit onderzoek. Zij schrijven dat er op dit vlak al veelbelovende resultaten zijn (gepubliceerd) maar dat 'Some issues remain unsolved'. Omdat zij niet toelichten welke issues dat zijn blijft de rationale voor het project onduidelijk. Het blijft eveneens onduidelijk waarom zij twee materialen willen ontwikkelen, en waarom zij een experiment met groeifactoren willen doen. De onderzoekers worden verzocht dit te verduidelijken.

-3.4.1.

*De onderzoekers doen er verstandig aan in dit deel van het project aandacht te besteden aan de planning van het onderzoek. Waarom wordt voorzien dat het project tot 1-11-2017 duurt?

*Het gebruik van groeifactoren is nog niet opgenomen in de strategie-beschrijving van het project.

*De verantwoording voor het aantal in vivo te testen materialen en voor de keuze van deze materialen is nog onvoldoende. De onderzoekers worden verzocht dit beter toe te lichten.

- **Description of Animal Procedures:**

-A, eerste vraag. De onderbouwing voor het aantal tijdstippen en de keuze voor deze tijdstippen ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.

- A, tweede vraag. De genoemde groeifactoren hebben een zeer verschillende uitwerking. De onderzoekers worden verzocht een keuze te maken en deze te onderbouwen.

-B. Het experimentele design is nog onduidelijk. De onderzoekers worden verzocht te verduidelijken of zij botdefecten in zowel de femora als de tibia maken, en deze keuze te onderbouwen. Bij het aanbrengen van 4 botdefecten kunnen alle condities in één dier onderzocht worden, waardoor de spreiding afneemt en er minder dieren nodig zijn. De onderzoekers worden verzocht de experimentele groepen duidelijker te omschrijven en aan te geven welke combinaties van materialen zij in elke groep willen testen. Ook worden zij verzocht toe te lichten waarom zij in het groeifactor experiment ook de condities 'geen defect' en 'empty defect' opnieuw willen testen. Indien deze controle condities noodzakelijk zijn worden de onderzoekers verzocht het design van het experiment zodanig aan te passen dat de controle condities van de experimenten met en zonder groeifactoren gedeeld kunnen worden.

-K. De omschrijving van de duur van het ongerief als gevolg van de anesthesie en de operatie is niet juist. De onderzoekers worden verzocht dit opnieuw te formuleren.

- Datum antwoord: 25-06-2015

- Strekking van de antwoorden:

- **Niet-technische samenvatting:**

Answer: Zoals voorgesteld is de text aangepast , en sluit deze nu hopelijk wel aan bij de doelgroep.

- **Project Proposal:**

- Answer: The titel is corrected

- -3.1.

Answer: We have added a clear explanation about two main issues that we want to solve in multi modal imaging , which are the blooming effect caused by SPIO particles in MRI; and the short lifetime of gold particles in CT analyses. We agree with reviewer that the initially

mentioned two materials were unclear. Actually we aim to develop only one final material even though in the project this will be tested two different contrast agent compositions. This is now clarified throughout. A coherent explanation about the use of growth factors is included as well.

-3.4.1.

*Answer: we estimated that the total time needed for this project is 25 months ; since there is limited capacity on the PRIME equipment the experiment will likely be executed in smaller runs. With preparation, imaging, and then (histological) processing approximately 7-8 months per step are envisioned hence the end date was set November 2017.

*Answer: changed as suggested; explanation about growthfactors is added in this section.

*Answer: Also see above, there is only one material which will be supplemented with different contrast agents. The number of compositions to be tested is based on the already completed *in vitro* studies on detectability, quality of the image, intensity of the signal and resolution. Explanation has been added to the text.

- **Description of Animal Procedures:**

-A, eerste vraag. Answer: the choice of the time points (i.e. 4 and 8 weeks) comes from literature and from our previous studies. The researcher provided some references for this information in the `Project Proposal` in the section 3.4.1.

-A, tweede vraag. Answer: We want to validate whether our imaging signal is in agreement with the actual degradation of CaP material (by osteoclasts) and formation of bone (by osteoblasts). Therefore we want to use both growth factors because RANKL can induce an osteoclast proliferation that can lead to a faster material degradation, while, from the other side, BMP-2 can induce endogenous bone formation.

-B. Answer: The rat tibia is too small for the proposed cylindrical defect. It does not allow the injection of enough material. The researcher provided a table with the list of the experimental group foreseen and agrees with the reviewer about the fact that the control groups (such as non defect and empty defect) do not need to be repeated when the growth factors will be tested.

-K. Answer: reformulated as requested

- De vragen hebben geleid tot aanpassingen in het projectvoorstel en de beschrijving van de dierproeven.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop a biodegradable material for hard tissue engineering which can be longitudinally imaged with high spatial resolution using different multimodal imaging approaches.' Calcium fosfaat cement (CPC) wordt veel gebruikt als botvervangend materiaal in de kliniek bij onder meer craniofaciale chirurgie, en orthopaedische en kaakimplantaten. CPC heeft zeer goede biologische eigenschappen, maar is op scans vrijwel niet te onderscheiden van autoloog bot. De onderzoekers willen contrastmateriaal toevoegen aan CPC, waardoor het te zien zal zijn op scans waarbij geen radioactieve straling wordt gebruikt. Het genezingsproces is daardoor beter te volgen op een voor de patiënt minder belastende manier. Tevens wordt door dit onderzoek het effect van toevoeging van groeifactoren aan CPC op de afbraak van dit synthetische materiaal en de vorming van nieuw bot bij ratten duidelijk. Op termijn kunnen de resultaten van dit onderzoek bijdragen aan betere monitoring van patiënten, bijvoorbeeld doordat abnormaliteiten, infecties en haarscheurtjes in of rond een aangebracht implantaat beter zijn te onderkennen. Het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn verantwoord en kunnen, binnen de gevraagde termijn, leiden tot beantwoording van de gestelde vragen en daarmee tot het behalen van de doelstelling. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven en beschikt over alle benodigde voorzieningen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de zichtbaarheid op scans van de onderzochte materialen, en over het effect van het toevoegen van groeifactoren aan deze materialen op de vervanging van het synthetische materiaal door nieuw bot bij ratten.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen en opvullen van een aantal botdefecten, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde botoperaties en scans onder anesthesie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de dieren is derhalve juist ingeschat in de aanvraag, te weten matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro en ex vivo met behulp van slachtmateriaal uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor de resterende onderzoeksvragen is het onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Er worden twee botdefecten per proefdier aangebracht om het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. De resultaten uit het eerste deel worden gebruikt om het meest veelbelovende materiaal uitgebreider te testen in aanwezigheid van groeifactoren. Het

maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd van het project. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 120 ratten.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven met betrekking tot de vraag welk contrastmateriaal dat wordt toegevoegd aan CPC leidt tot de beste beelden bij niet-radioactieve imaging, en met betrekking tot de vraag of het effect van toevoeging van groeifactoren meetbaar is. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een synthetisch botvervangend materiaal dat beter zichtbaar is op scans. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel, omdat eventuele complicaties bij bijvoorbeeld implantaten beter en sneller zijn vast te stellen met minder belasting van de patiënt.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aanbrengen en opvullen van botdefecten en de scans. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

██████████

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015229

Bijlagen

2

Datum 28-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015229. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN (628)

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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: 24 september 2015
Geplande einddatum: 1 november 2017
Titel project: Imaging in hard tissue engineering
Titel niet-technische samenvatting: Beeldvorming in harde tissue engineering
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 25 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015229

Bijlagen

2

Datum 28-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 28 augustus 2015

Vervaldatum: 27 september 2015

Factuurnummer: 201570229

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015229	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 8 september 2015 12:36
Aan: info@zbo-ccd.nl [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Vragen AVD103002015229

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte leden CCD,

Hierbij onze antwoorden tav uw mail dd 4 sept jl.

1) Er zijn drie redenen om mannelijke ratten te gebruiken. Ten eerste, is het bekend dat mannen een betrouwbaardere opzet vormen omdat de botheling niet beïnvloed wordt door hormonale schommelingen. Ten tweede zijn in vrijwel alle eerdere literatuur referenties waarin dit model gebruikt wordt, ook mannelijke dieren gebruikt. Voor de vergelijkbaarheid met de wetenschappelijke literatuur is dus ook het gebruik van mannelijke dieren gewenst. Tenslotte, is er nog een praktische reden; nl. de grootte van de femorale condyl is verschillend tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Het is alleen in mannelijke dieren goed mogelijk om het voorgestelde botdefect te prepareren [Ref. Tissue Eng Part C Methods. 2014 Jun;20(6):493-505].

2) Verzoek om het aantal dan aan te passen naar 108

3) Leges zijn verstuurd, met factuurnummer 201570229 op 2 sept jl.

Vr Groet namens de aanvragers,

[REDACTED]

Kind regards,

[REDACTED]

Radboud universitair medisch centrum

[REDACTED]
Shipping address: P.O.Box 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED], The Netherlands

Street address: [REDACTED], The Netherlands

All my publications: [REDACTED]

Department website: [REDACTED]

Present: Monday / Tuesday / Thursday / Friday

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Verzonden: vrijdag 4 september 2015 16:26

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: Vragen AVD103002015229

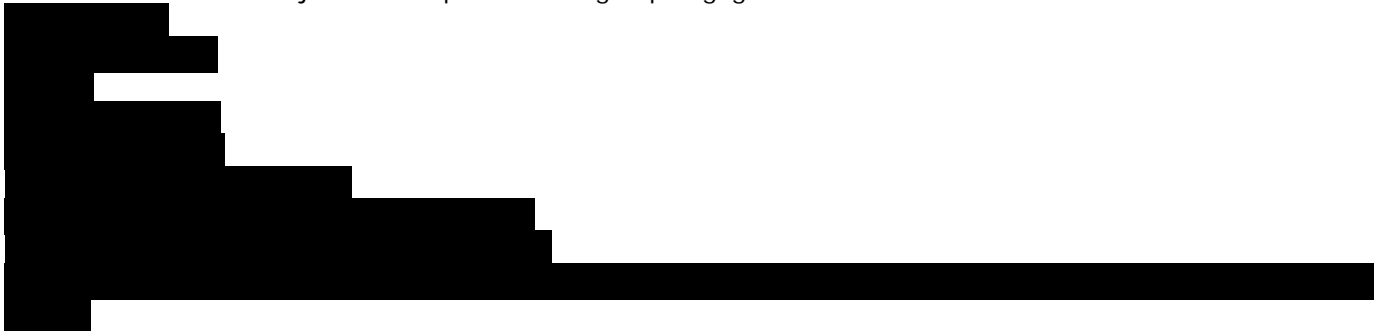
Geachte meneer [REDACTED]

Op 25 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Imaging in hard tissue engineering" met aanvraagnummer AVD103002015229.

Er zijn nog enkele zaken onduidelijk.

U geeft aan mannelijke ratten te willen gebruiken. Is het mogelijk ook vrouwelijke dieren te gebruiken, of kunt u aangeven waarom dat niet mogelijk is?

In uw Beschrijving Dierproeven beschrijft u dat er 12 ratten per groep worden gebruikt. U komt dan op 120 ratten in totaal. Er wordt een lijst van 9 experimentele groepen gegeven:



9 x 12 = 108. Hoe komt u aan 120 ratten?

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Zoals in de factuur staat, moeten de leges binnen 30 dagen door ons zijn ontvangen. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via e-mail. Om uw aanvraag in de volgende vergadering te kunnen bespreken, vraag ik u om uiterlijk **15 september 2015** te reageren.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. 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.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Met vriendelijke groeten,
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)
E: info@zbo-ccd.nl

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015229

23 SEP. 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 25 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Imaging in hard tissue engineering" met aanvraagnummer AVD103002015229. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 september 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld. Het aantal dieren is aangepast en er is gevraagd naar de te gebruiken geslachten.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Imaging in hard tissue engineering" starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 september 2015 tot en met 1 november 2017.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

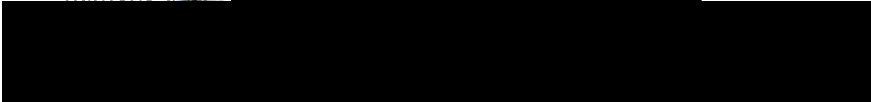
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze: 


Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 september 2015 tot en met 1 november 2017, voor het project "Imaging in hard tissue engineering" met aanvraagnummer AVD103002015229, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student. Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 augustus 2015, ontvangen op 25 augustus 2015.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 september 2015

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
rat condyle defeact	Ratten (Rattus norvegicus) / adult male Wistar (about 6 weeks old)	108	Matig / moderate	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0035
2. Titel van het project: Imaging in hard tissue engineering.
3. Titel van de NTS: Beeldvorming in harde tissue engineering.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 22-05-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-06-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-06-2015 tot 25-06-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 25-06-2015
 - advies aan CCD: 24-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-06-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Er staan nog veel taalfouten in deze aanvraag. Wij adviseren u de tekst van deze projectaanvraag nogmaals goed na te kijken met meer aandacht voor het verbeteren van formuleringen (o.a. enkel- of meervoudsvormen, tegenwoordige of verleden tijd), grammatica en spelfouten, en hierbij het vier-ogen-principe toe te passen.
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - De woordkeus in onderdeel 3.1 is nog onvoldoende afgestemd op de doelgroep. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.
 - **Project Proposal:**
 - De titel bevat een spelfout.

-3.1. Uit de gegeven achtergrond wordt onvoldoende duidelijk wel kennishiaat de onderzoekers willen vullen met de resultaten van dit onderzoek. Zij schrijven dat er op dit vlak al veelbelovende resultaten zijn (gepubliceerd) maar dat 'Some issues remain unsolved'. Omdat zij niet toelichten welke issues dat zijn blijft de rationale voor het project onduidelijk. Het blijft eveneens onduidelijk waarom zij twee materialen willen ontwikkelen, en waarom zij een experiment met groeifactoren willen doen. De onderzoekers worden verzocht dit te verduidelijken.

-3.4.1.

*De onderzoekers doen er verstandig aan in dit deel van het project aandacht te besteden aan de planning van het onderzoek. Waarom wordt voorzien dat het project tot 1-11-2017 duurt?

*Het gebruik van groeifactoren is nog niet opgenomen in de strategie-beschrijving van het project.

*De verantwoording voor het aantal in vivo te testen materialen en voor de keuze van deze materialen is nog onvoldoende. De onderzoekers worden verzocht dit beter toe te lichten.

- **Description of Animal Procedures:**

-A, eerste vraag. De onderbouwing voor het aantal tijdstippen en de keuze voor deze tijdstippen ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.

- A, tweede vraag. De genoemde groeifactoren hebben een zeer verschillende uitwerking. De onderzoekers worden verzocht een keuze te maken en deze te onderbouwen.

-B. Het experimentele design is nog onduidelijk. De onderzoekers worden verzocht te verduidelijken of zij botdefecten in zowel de femora als de tibia maken, en deze keuze te onderbouwen. Bij het aanbrengen van 4 botdefecten kunnen alle condities in één dier onderzocht worden, waardoor de spreiding afneemt en er minder dieren nodig zijn. De onderzoekers worden verzocht de experimentele groepen duidelijker te omschrijven en aan te geven welke combinaties van materialen zij in elke groep willen testen. Ook worden zij verzocht toe te lichten waarom zij in het groeifactor experiment ook de condities 'geen defect' en 'empty defect' opnieuw willen testen. Indien deze controle condities noodzakelijk zijn worden de onderzoekers verzocht het design van het experiment zodanig aan te passen dat de controle condities van de experimenten met en zonder groeifactoren gedeeld kunnen worden.

-K. De omschrijving van de duur van het ongerief als gevolg van de anesthesie en de operatie is niet juist. De onderzoekers worden verzocht dit opnieuw te formuleren.

- Datum antwoord: 25-06-2015

- Strekking van de antwoorden:

- **Niet-technische samenvatting:**

Answer: Zoals voorgesteld is de text aangepast , en sluit deze nu hopelijk wel aan bij de doelgroep.

- **Project Proposal:**

- Answer: The titel is corrected

- -3.1.

Answer: We have added a clear explanation about two main issues that we want to solve in multi modal imaging , which are the blooming effect caused by SPIO particles in MRI; and the short lifetime of gold particles in CT analyses. We agree with reviewer that the initially

mentioned two materials were unclear. Actually we aim to develop only one final material even though in the project this will be tested two different contrast agent compositions. This is now clarified throughout. A coherent explanation about the use of growth factors is included as well.

-3.4.1.

*Answer: we estimated that the total time needed for this project is 25 months ; since there is limited capacity on the PRIME equipment the experiment will likely be executed in smaller runs. With preparation, imaging, and then (histological) processing approximately 7-8 months per step are envisioned hence the end date was set November 2017.

*Answer: changed as suggested; explanation about growthfactors is added in this section.

*Answer: Also see above, there is only one material which will be supplemented with different contrast agents. The number of compositions to be tested is based on the already completed *in vitro* studies on detectability, quality of the image, intensity of the signal and resolution. Explanation has been added to the text.

- **Description of Animal Procedures:**

-A, eerste vraag. Answer: the choice of the time points (i.e. 4 and 8 weeks) comes from literature and from our previous studies. The researcher provided some references for this information in the 'Project Proposal' in the section 3.4.1.

-A, tweede vraag. Answer: We want to validate whether our imaging signal is in agreement with the actual degradation of CaP material (by osteoclasts) and formation of bone (by osteoblasts). Therefore we want to use both growth factors because RANKL can induce an osteoclast proliferation that can lead to a faster material degradation, while, from the other side, BMP-2 can induce endogenous bone formation.

-B. Answer: The rat tibia is too small for the proposed cylindrical defect. It does not allow the injection of enough material. The researcher provided a table with the list of the experimental group foreseen and agrees with the reviewer about the fact that the control groups (such as non defect and empty defect) do not need to be repeated when the growth factors will be tested.

-K. Answer: reformulated as requested

- De vragen hebben geleid tot aanpassingen in het projectvoorstel en de beschrijving van de dierproeven.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop a biodegradable material for hard tissue engineering which can be longitudinally imaged with high spatial resolution using different multimodal imaging approaches.' Calcium fosfaat cement (CPC) wordt veel gebruikt als botvervangend materiaal in de kliniek bij onder meer craniofaciale chirurgie, en orthopaedische en kaakimplantaten. CPC heeft zeer goede biologische eigenschappen, maar is op scans vrijwel niet te onderscheiden van autoloog bot. De onderzoekers willen contrastmateriaal toevoegen aan CPC, waardoor het te zien zal zijn op scans waarbij geen radioactieve straling wordt gebruikt. Het genezingsproces is daardoor beter te volgen op een voor de patiënt minder belastende manier. Tevens wordt door dit onderzoek het effect van toevoeging van groeifactoren aan CPC op de afbraak van dit synthetische materiaal en de vorming van nieuw bot bij ratten duidelijk. Op termijn kunnen de resultaten van dit onderzoek bijdragen aan betere monitoring van patiënten, bijvoorbeeld doordat abnormaliteiten, infecties en haarscheurtjes in of rond een aangebracht implantaat beter zijn te onderkennen. Het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn verantwoord en kunnen, binnen de gevraagde termijn, leiden tot beantwoording van de gestelde vragen en daarmee tot het behalen van de doelstelling. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven en beschikt over alle benodigde voorzieningen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de zichtbaarheid op scans van de onderzochte materialen, en over het effect van het toevoegen van groeifactoren aan deze materialen op de vervanging van het synthetische materiaal door nieuw bot bij ratten.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen en opvullen van een aantal botdefecten, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde botoperaties en scans onder anesthesie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de dieren is derhalve juist ingeschat in de aanvraag, te weten matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro en ex vivo met behulp van slachtmateriaal uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor de resterende onderzoeksvragen is het onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Er worden twee botdefecten per proefdier aangebracht om het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. De resultaten uit het eerste deel worden gebruikt om het meest veelbelovende materiaal uitgebreider te testen in aanwezigheid van groeifactoren. Het

maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd van het project. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 120 ratten.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven met betrekking tot de vraag welk contrastmateriaal dat wordt toegevoegd aan CPC leidt tot de beste beelden bij niet-radioactieve imaging, en met betrekking tot de vraag of het effect van toevoeging van groeifactoren meetbaar is. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een synthetisch botvervangend materiaal dat beter zichtbaar is op scans. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel, omdat eventuele complicaties bij bijvoorbeeld implantaten beter en sneller zijn vast te stellen met minder belasting van de patiënt.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aanbrengen en opvullen van botdefecten en de scans. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015234								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Factuurinformatie				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	
11	Mail terugkoppeling DEC 8-10-2015				x		x	x	



01 SEP. 2015

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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10
Postbus	9101
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
IBAN	NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	Postdoc	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	UHD	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam [REDACTED]
 Functie [REDACTED]
 Plaats Nijmegen
 Datum 31 - 08 - 2015
 Handtekening [REDACTED]

Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> Higher education or training |
|-----|---|--|

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

The two most common types of dementia in the elderly are Alzheimer's disease (AD) and vascular dementia (VaD). AD is characterised by progressive cognitive impairment (e.g. memory loss) and accumulation of amyloid β (A β) and tau protein in the brain parenchyma and vasculature [1]. Cognitive impairment in VaD is the result of strokes in the brain and is often more stepwise than progressive [2]. AD and VaD have therefore long been treated as two separate types of dementia.

Epidemiological studies have recently established that CVD, VaD and AD are more closely linked than previously thought. For example, CVD and AD share a great number of (vascular) risk factors, including diabetes, atherosclerosis and high blood pressure [3]. Furthermore, other vascular abnormalities, such as decreased microvascular density and basement membrane thickening [4], can be detected in many AD brains. AD patients also have a higher risk for stroke [5], with about 30-50% of AD patients displaying evidence of minor and major stroke upon autopsy [6]. Although it is known that stroke can contribute to the severity of cognitive impairment in AD [7], the exact role of stroke in AD remains to be investigated. In any case, vascular disorders and AD can no longer be considered strictly separate conditions. So-called mixed dementia, with post-mortem pathological evidence for both CVD and AD, is now thought to be much more common in the elderly than any of the 'pure' forms of dementia [8]. The clinical criteria to distinguish mixed dementia from AD and other dementias however remain to be clearly defined.

Clinically diagnosing AD, VaD and other types of dementia requires a neurological evaluation of the patient combined with an evaluation of cerebrospinal fluid biomarkers (e.g. A β and tau) and/or neuroimaging profiles. Neuroimaging techniques provide a wide range of structural and functional information that quite accurately reflect neuropathology upon autopsy [9]. Recent advances in imaging techniques now allow for the *in vivo* visualization of parameters such as brain connectivity (resting state functional magnetic resonance imaging; rs-fMRI), gray and white matter integrity (diffusion tensor imaging; DTI) and blood perfusion (arterial spin labelling; ASL). In dementia and CVD, imaging has provided valuable differential diagnostic information, demonstrating for example the atrophy patterns and A β deposits typical for AD [10] and the lesions and network reorganizations associated with CVD [11]. It can be hypothesized that a distinctive imaging pattern of neuropathology accompanies AD that is

preceded by a stroke event. Indeed, despite possessing a course of disease suggestive of AD, imaging has revealed that mixed dementia patients have a higher rate of white matter changes than AD patients [12]. To our knowledge, this is the only imaging data on mixed dementia to date, emphasizing the need for further investigation of the neuroimaging patterns associated with this type of dementia.

To investigate the pathogenic mechanisms behind AD, transgenic animal models for AD, expressing (mutant forms of) the amyloid precursor protein (APP), have been developed. Stroke is most commonly modelled in mice by occluding the left or right middle cerebral artery (MCA) [13], either transiently (30-120 minutes) or permanently. The longer the MCA is occluded, the more severe the infarct that is generated will be. Previous studies have demonstrated that the induction of an ischemic event in AD mouse models can exacerbate AD pathology and ischemic lesion size, accompanied by an increased disturbance of cognition [14-16], thus mimicking what is seen in AD patients with stroke. None of these animal studies have however examined neuroimaging parameters, they have mainly focused on elucidating the bidirectional interaction between APP/A β and ischemic injury and the potential role of inflammation. As advanced neuroimaging techniques are now available for small animals such as mice [17, 18], it is feasible to gain more insight into AD pathology and the role of stroke. These techniques will furthermore allow for an extensive structural and functional assessment of future treatments for stroke and/or AD.

Currently, treatment strategies for AD and stroke are still lacking. As both CVD and AD share a number of vascular risk factors [3], therapeutically addressing these factors may be beneficial for both conditions. In the Western population, vascular risk factors are closely linked to the consumption of high amounts of cholesterol, calories and saturated fats. Therefore, it can be hypothesized that changing to a healthier diet may improve the development and severity of both AD and stroke. Indeed, the so-called Mediterranean diet, consisting of relatively high amounts of fish, fruit and vegetables, has been shown to lower CVD and AD incidence and risk [19, 20]. Certain diets have even been shown to improve some of the brain damage associated with stroke and AD. For example, we have previously shown that a [REDACTED] diet, containing a specific combination [REDACTED], has a beneficial effect on neurodegenerative processes, cerebral blood flow and cognition in a mouse model for AD [21-23] and wildtype mice modelling stroke (unpublished data). It remains to be investigated if a [REDACTED] diet can also improve mixed dementia pathology and symptoms.

In conclusion, as mixed dementia is now recognized as a common form of dementia, there is a need to further characterize this type of dementia and distinguish it from 'pure' forms of AD and other dementias. Furthermore, the lack of available treatments for CVD and dementias highlights the importance of testing novel treatment strategies, for example aimed at common risk factors for both these conditions. The availability of suitable mouse models and advanced neuroimaging techniques makes the above-mentioned studies possible. It should be mentioned that sex is an important risk factor for both AD and stroke, as both conditions appear to affect women more than men [24, 25]. In contrast, male sex is considered a risk factor for mixed dementia [26]. Taking this factor into account when designing epidemiological or experimental studies investigating (mixed) dementia therefore seems highly relevant, but is in our opinion too often ignored. In our current project, we will therefore examine the effect of stroke on AD in both sexes of a mouse model for mixed dementia.

References

1. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
2. Pasquier, F. and D. Leys, *Why are stroke patients prone to develop dementia?* J Neurol, 1997. **244**(3): p. 135-42.

3. Breteler, M.M., *Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(2): p. 153-60.
4. Humpel, C., *Chronic mild cerebrovascular dysfunction as a cause for Alzheimer's disease?* Exp Gerontol, 2011. **46**(4): p. 225-32.
5. Chi, N.F., et al., *Alzheimer disease and risk of stroke: a population-based cohort study*. Neurology, 2013. **80**(8): p. 705-11.
6. Kalaria, R.N., *The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(2): p. 321-30.
7. Snowdon, D.A., et al., *Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study*. JAMA, 1997. **277**(10): p. 813-7.
8. Schneider, J.A., et al., *Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons*. Neurology, 2007. **69**(24): p. 2197-204.
9. Roman, G. and B. Pascual, *Contribution of neuroimaging to the diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia*. Arch Med Res, 2012. **43**(8): p. 671-6.
10. Masdeu, J.C., W.C. Kreisl, and K.F. Berman, *The neurobiology of Alzheimer disease defined by neuroimaging*. Curr Opin Neurol, 2012. **25**(4): p. 410-20.
11. Dijkhuizen, R.M., et al., *Functional MRI and diffusion tensor imaging of brain reorganization after experimental stroke*. Transl Stroke Res, 2012. **3**(1): p. 36-43.
12. Rockwood, K., et al., *The diagnosis of "mixed" dementia in the Consortium for the Investigation of Vascular Impairment of Cognition (CIVIC)*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **903**: p. 522-8.
13. Chiang, T., R.O. Messing, and W.H. Chou, *Mouse model of middle cerebral artery occlusion*. J Vis Exp, 2011(48).
14. Heikkinen, R., et al., *Susceptibility to focal and global brain ischemia of Alzheimer mice displaying abeta deposits: effect of immunoglobulin*. Aging Dis, 2014. **5**(2): p. 76-87.
15. Koistinaho, M., et al., *Beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse A beta deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1610-5.
16. Zhang, F., et al., *Increased susceptibility to ischemic brain damage in transgenic mice overexpressing the amyloid precursor protein*. J Neurosci, 1997. **17**(20): p. 7655-61.
19. Estruch, R., et al., *Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet*. N Engl J Med, 2013.
20. Scarmeas, N., et al., *Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 2006. **59**(6): p. 912-21.
24. Andersen, K., et al., *Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies*. EURODEM Incidence Research Group. Neurology, 1999. **53**(9): p. 1992-7.
26. Zekry, D., J.J. Hauw, and G. Gold, *Mixed dementia: epidemiology, diagnosis, and treatment*. J Am Geriatr Soc, 2002. **50**(8): p. 1431-8.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The main objectives of this project are:

- 1) Study the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the AD brain to a) find novel (sex-specific) neuroimaging markers and/or predictors for mixed dementia and b) further elucidate (sex-specific) pathophysiological mechanisms linking stroke and AD.
- 2) Investigate the effect of a [REDACTED] diet on stroke- and AD-related cognition and brain network integrity.

To realize our objectives, mild experimental stroke will be induced in a mouse model for AD. Inducing stroke in mice has been well-described in literature (see section 3.1) and we have experience with the induction of ischemia in mice (unpublished data). To optimize the success rate of this procedure, experimental stroke induction will be performed in close collaboration with expert researchers in the field. We furthermore have access to the necessary neuroimaging facilities and behavioural equipment and have the required experience to perform neuroimaging ([REDACTED] and behavioural studies [REDACTED]. We have extensive experience working with mouse models for [REDACTED] and have extensive knowledge on the effects of [REDACTED] diets in both AD (references [REDACTED] and stroke models (unpublished data). Considering the above-mentioned experience, we believe that our objective is achievable in the 5 years requested for this project.

Additional references

[REDACTED]

3.3 Relevance

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

Social: AD is a major public health problem with patient numbers growing each year due to the aging of the world population. In part due to the highly heterogeneous nature of dementia, definite clinical diagnostics and effective treatment strategies are still lacking. Mixed dementia is now considered more common than 'pure' AD, but this type of dementia is hardly recognized to date. Distinguishing mixed dementia from other types of AD is relevant as for example patients suffering from this type of dementia may benefit from different (stroke-directed) treatment options than 'pure'

AD patients. Therefore, defining neuroimaging parameters specific for mixed dementia will not only benefit the differential diagnosis of dementias, it may potentially improve treatment outcome for a large group of dementia patients. Including the risk factor sex may furthermore enhance the personalized healthcare strategy, i.e. diagnostics and treatments tailored to individual patients, that is receiving increasing attention in medicine today.

Scientific: It is still unclear if ischemic events can potentiate the development of classical AD lesions or if they are a consequence of pre-existing AD pathology. It is furthermore unknown what the exact role of the risk factor sex is on the aforementioned pathology. Investigating the effect of mixed dementia and a dietary intervention on neuroimaging parameters should give us more insight into the pathological mechanisms involved in this type of dementia and the potential role of gender. This in turn may result in the identification of novel (sex-specific) therapeutic and/or diagnostic targets.

3.4 Research Strategy

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

We aim to:

- 1) Investigate the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the AD brain by inducing experimental stroke in transgenic for APP (AD mouse model). To better align this animal experiment to different stages of human AD development, we have chosen a longitudinal design for our study. To investigate the potential role of sex, both male and female mice will (simultaneously) be used.
- 2) Investigate the acute effect of a [REDACTED] diet on cognition and neuroimaging markers after the induction of experimental stroke in mice transgenic for APP. To investigate the potential role of sex, both male and female mice will (sequentially) be used.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

This project will consist of two components, as specified in 3.4.1. The outline of these components is as follows:

- 1) In a transgenic mouse model for AD, motor skills and physiological parameters will be determined shortly before (baseline) and shortly after experimental stroke induction in both sexes. Shortly after a mild experimental stroke is induced, several neuroimaging techniques, such as [REDACTED] will be used to examine brain structure and function. To assess perfusion, parameters such as cerebral blood flow and vasoactivity will also be measured with imaging techniques (e.g. arterial spin labelling; ASL). The chosen neuroimaging paradigm will be repeated at least two times with a time interval of several months. Furthermore, to assess the efficacy of the ischemic stroke and the level of AD pathology, behaviour, cognition and/or motor skills will be measured at least once after the ischemic stroke, using tests such as the open field, Morris water maze and grip test. Physiological parameters (e.g. blood pressure, body weight, etc) will be monitored throughout the experiment to assess the impact of stroke and/or age-related AD pathology on the general health of the animals. Six to eight months after experimental stroke induction, mice will be sacrificed.
- 2) In a transgenic mouse model for AD, baseline cognitive and motor skills and physiological parameters will be determined shortly before experimental stroke induction. Immediately after mild experimental stroke is induced, half of the mice will be switched from a control diet to a [REDACTED] diet. A few weeks after induction of stroke, a neuroimaging paradigm similar to the one performed in component 1 will be performed to examine brain structure, function and perfusion. Furthermore, the effect of diet will be assessed in a number of behavioural tests, such as the Barnes or Morris water maze and the open field. Physiological parameters (e.g. body weight, etc) will be monitored throughout the experiment to

assess general health of the animals and the impact of stroke and/or age-related AD pathology and/or diet on the general health of the animals. About two months after experimental stroke induction, mice will be sacrificed. Due to the large number of variables being tested (e.g. diet and stroke and AD), this experiment will first be performed only in males. If improvements of treatment with a [REDACTED] diet are found in males, component 2 will be performed once more in females.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

In the two components of this project we will try to elucidate the mechanistic, diagnostic and therapeutic implications of mixed dementia. To this end, in both components we will induce mild experimental stroke in a mouse model for AD. The first component is aimed at finding novel neuroimaging markers for mixed dementia and elucidating pathological mechanisms in this type of dementia. In this component we will furthermore take the risk factor sex into account. The second component is aimed at determining the potential therapeutic effect of a [REDACTED] diet on this type of dementia.

To study this we formulated the following milestones:

1. Combining AD pathology with stroke leads to novel (sex-specific) neuroimaging patterns that can distinguish this type of dementia from 'pure' AD and provide more mechanistic insight into mixed dementia pathology. If no immediate effects of stroke on neuroimaging and/or motor parameters are found in the first two subgroups of mice that undergo experimental stroke (see appendix 1), we will not continue with the remainder of appendix 1 or appendix 2 ('go/no go' point).

As soon as (early) stroke-related changes in neuroimaging and/or motor or behavioural parameters are found in component 1 ('go/no go' point), we may start with component 2 in which we hypothesize that:

2. Treating mixed dementia with a [REDACTED] diet acutely improves cognition and/or improves brain network integrity in male mice. If these effects of diet are seen in males ('go/no go' point), the same effect will be studied in female AD mice.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Longitudinal effect of stroke and AD on neuroimaging and cognitive parameters
2	Acute effects of [REDACTED] diet on mixed dementia parameters

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Longitudinal effect of stroke and AD on neuroimaging and cognitive parameters

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

With the animal procedures described in this appendix, we aim to investigate the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the Alzheimer's disease (AD) brain. To this end we will induce mild experimental stroke in mice transgenic for amyloid precursor protein (APP) (AD mouse model) and wildtype controls and, as a primary outcome parameter, collect neuroimaging data. Imaging the brain is a non-invasive way to assess brain function and structure during life and is therefore the best tool to assess these parameters. Furthermore, as imaging is non-invasive, these techniques can be performed several times in the same animal, allowing for a longitudinal follow-up of individual mice. In our opinion, a longitudinal design better aligns the animal experiment to the different stages of human AD development, increasing the relevance of our study.

A secondary outcome parameter of our study is the cognitive and motor function of AD mice with experimentally induced mild stroke. Both cognition and motor skills are known to be affected by AD and (experimental) stroke and it is therefore relevant to assess a potential cumulative effect of AD and stroke on these parameters. We will select tests that are not too severe for the animals to perform while still relaying relevant data.

Experimental stroke will be induced by transiently occluding the middle cerebral artery (MCAO) in the experimental groups. Before starting the actual experiment, the entire MCAO procedure will be optimized in surplus mice available at the animal facility of [REDACTED]. The neuroimaging procedure will be optimized in a few more surplus mice (that have not been used for MCAO practice). Finally, as gender is an important risk factor of both AD and stroke, we believe it is highly relevant to relate the aforementioned primary and secondary outcome parameters to the sex of the mice. We will therefore use both male and female mice in the actual experiment.

In summary, the general design of the actual experiment is as follows:

1. Measuring physiological parameters and assessing baseline motor skills (coordination tests)
2. Inducing mild experimental stroke by transient MCAO (followed by at least one week of recovery)
3. Motor tests and physiological parameters (1-3 weeks after MCAO)
4. Neuroimaging paradigm (2-4 weeks after MCAO)
5. Repeat of neuroimaging paradigm (one or two times, with several months between paradigms)
6. Behavioral and motor tests (several months after MCAO)
7. Final neuroimaging paradigm and sacrifice (6-8 months after MCAO)

For practical reasons, a maximum of 40 animals can be handled at one time when inducing experimental stroke. Therefore, the total number of mice needed to obtain statistically relevant data will be subdivided in at least four subgroups.

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

A few weeks before experimental stroke induction, mice are moved to the animal facility where neuroimaging and behavioural tests will be performed [REDACTED] and acclimatized for at least one week. As motor skills will be affected by stroke induction, 2-4 simple motor tests will be performed prior to stroke induction (assess baseline motor skills). We will choose tests that are relatively undemanding for the mice (e.g. Pole test, Corner test and Grip test) and have been performed in previous studies assessing the motoric consequences of MCAO. Right before experimental stroke induction, baseline physiological parameters (body weight etc.) will be registered to monitor the health of the animals. As we expect blood pressure (BP) to be affected by both AD pathology and stroke, we will measure BP as an additional physiological parameter. We will select a non-invasive way of measuring BP (tail cuff plethysmography). This method will likely require a few days of habituating the mice to the measurement equipment. This habituation will take place one or two weeks before experimental stroke induction. After habituation, BP will be measured at regular time intervals during the entire experiment.

Transient mild experimental stroke, resulting in focal ischemia, will be induced in young adult transgenic AD mice and age-matched wildtype controls (e.g. littermates) by occluding the middle cerebral artery (MCAO) under general, adequate anaesthetics for a maximum of 30 minutes. MCAO is a well-described and robust method to induce experimental stroke in mice [1]. To estimate occlusion success, cerebral blood flow will be monitored during surgery using Laser Doppler Flow. After surgery, all mice are individually housed and allowed to recover for at least one week. After the recovery period, physiological parameters will be carefully monitored and proper analgesia will be given to reduce any discomfort or pain. Furthermore, expected neurological deficits, such as forelimb weakness and circling to the affected side, will be determined and the aforementioned motor tests (e.g. Pole test, Corner test, Grip test) will be performed to assess the success of the MCAO. A separate group of AD and wildtype mice will receive a sham operation, undergoing similar anaesthetics and surgery but not the actual MCAO (i.e. reduction in blood flow). Sham-operated animals will, among other things, allow us to better assess the effects of stroke on cognition in both wildtype and AD mice.

Two to four weeks after the recovery period, a first set of non-invasive neuroimaging experiments will be performed to measure parameters such as lesion size (diffusion weighted imaging; DWI), neuronal connectivity (resting state functional magnetic resonance imaging; RS-fMRI) and cerebral blood flow (arterial spin labelling; ASL). For neuroimaging, mice are anaesthetised using isoflurane via inhalation. During the neuroimaging experiments, physiological parameters such as heart rate and body temperature are closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. The entire neuroimaging paradigm (e.g. RS-fMRI, DWI, ASL) will take a maximum of 2 hours per mouse, after which mice are allowed to awake and recover. The paradigm will be repeated one or two more times with a (regular) time interval of several months.

Six to eight months after MCAO, potential cognitive deficits and motor abnormalities will be assessed in the aforementioned motor tests (e.g. Pole test, Corner test and Grip test) and behavioural tests such as Open field and the Barnes or Morris water maze. Similar behavioural tests have been performed in previous studies exploring the effects of ischemia in AD mouse models and will therefore allow for a comparison of our study with these previous studies. In total, these motor and behavioural tests may take up to two weeks to perform. A few days after the last behavioural test has been performed, the aforementioned neuroimaging paradigm will be performed one last time for each mouse (6-8 months after MCAO). Immediately after these scans, mice will be sacrificed without arousal from the anaesthesia.

It should be mentioned that, supervised by experienced technicians/researchers from inside and outside [REDACTED] all involved researchers/technicians will practice experimental occlusion on surplus wildtype mice to optimize the success rate of the

occlusion in the actual experiment. As positioning the mice in the scanner and operating the scanner requires some skill, the neuroimaging procedures will also be optimized before the start of the actual experiments. This optimization should minimize stress for the animals used during the actual neuroimaging experiments.

References

1. Macrae, I.M., *Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1062-78.

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

G*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ($P < 0.05$; Power: 0.80). To estimate effect size (d), comparable studies previously performed by us and described in literature are explored. Furthermore, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. Finally, randomly assigning mice to the sham and MCAO groups and treating and housing both groups similarly, should also contribute to minimizing group sizes.

MCAO will be practiced on surplus mice before the actual experiment takes place, to ensure MCAO is successful in as much of the requested mice as possible during the actual experiment. With a separate set of surplus animals the neuroimaging procedure will be practiced to ensure experienced handling of the mice during the actual neuroimaging procedures.

B. The animals

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

Species: For several reasons, we will use mice (*Mus musculus*) for our project. Not only is AD mostly modeled in mice, stroke induction is also well-validated in this species. Furthermore, on a more practical note, [REDACTED] we will use for neuroimaging is only accessible to mice. We are highly experienced working with mice and AD mouse models in particular.

Origin: 'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen'

Estimated numbers: Based on the power analysis and taking the expected mortality rates of MCAO and Sham in wildtype (~35% and ~0% resp.) and AD mice (~60% and ~10% resp.) into account, we expect to need about 180 mice (90 male and 90 female, 40% wildtype and 60% AD mice) for the actual experiment. Mortality rates are based on previous experiments (e.g. [1]) and may be the result of unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage) and/or, in case of seizure-prone AD mice [2], prolonged seizing. With this total number of mice, we expect to ultimately, after MCAO-related mortality, end up with the required number of mice to obtain statistically relevant data ($n \sim 14-15$ per experimental group). Both male

and female mice will be divided into the following experimental groups: wildtype-Sham, AD-Sham, wildtype-MCAO and AD-MCAO. We furthermore expect to need about 50 surplus wildtype mice to optimize MCAO and neuroimaging.

Life stages: The level of AD pathology, rather than aging, is leading in choosing the suitable life stage of the mice. For the experiment described in this appendix, we will induce mild experimental stroke in young adult mice that have a minimal amount of AD pathology (representing early stage of AD). This will allow us to longitudinally monitor stroke-related effects on AD pathology development, thus aligning this animal experiment to different stages of human AD development. Mice will be sacrificed when they are mature adult mice (representing advanced stage of AD).

1. Kemppainen, S., et al., *Behavioral and neuropathological consequences of transient global ischemia in APP/PS1 Alzheimer model mice*. Behav Brain Res, 2014. **275**: p. 15-26.
2. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse	'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen'	230	young adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: To study the complex interaction of both stroke and AD on brain structure and function, it is not possible to use relatively simple animals or *in vitro* models. We have chosen mice as these animals are 1) the most commonly used to model the pathology of AD (i.e. amyloid β deposition) and 2) they are, with rats, the only animals where MCAO is performed to experimentally induce stroke. Finally, using mice allows us to study stroke and AD-related behavioural and neurological deficits, parameters that cannot be studied *in vitro*, but are highly relevant when translating findings to human studies.

Reduction: This experiment cannot be performed with less animals, as the chosen numbers have been carefully calculated to obtain statistically relevant results while taking a high expected mortality rate, as a result of the MCAO and the development of AD, into account. Furthermore, as previously mentioned, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. We will further minimize the number of mice needed by choosing a longitudinal rather than a cross-sectional study design. Mortality rates will be kept as low as possible by optimizing MCAO and neuroimaging with wildtype surplus mice before starting the experiment described in this appendix.

Refinement: There are currently no other techniques available to model ischemic stroke with less discomfort to the mice than the MCAO technique we will use. However, several measures will be taken to minimize pain and distress of the animals. For example, mild experimental stroke will be induced using standard operating methods and under general anesthetics. We will furthermore use a relatively non-invasive method of MCAO (e.g. no opening of the skull) and use occlusion tools that insure high reproducibility of the lesion size in different mice. To optimize the success rate, mild experimental stroke induction will furthermore be optimized and/or performed in close collaboration with expert researchers in the field. Neuroimaging experiments will also be optimized and performed under anaesthesia to minimize distress. The least stressful behavioural and neurological tests (based on literature) will be chosen. When possible, mice will be habituated to tools and procedures to further minimize stress levels. Finally, it should be mentioned that mice will receive ample time to recover from the most distressing procedures before a new stressful procedure is started.

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

To minimize animal suffering, pain and fear the most distressing and painful procedures will be performed by experienced technicians/researchers. Furthermore, general anaesthesia and optimal post-surgery care, including analgesia, will be given. Only after a suitable recovery period will further animal procedures be performed. When possible, mice will be habituated to any tools or procedures that may be considered stressful to the animals, including certain behavioural setups (e.g. Pole test, Open field) and the measurement of blood pressure.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable (not legally required)

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

After the occlusion, the animals will be individually housed to optimize healing of the surgical wound and better monitor physiological parameters (food intake etc.) and stroke-related abnormalities (e.g. abnormal motor function). Female mice in particular will experience discomfort as a result of the individual housing (severity: mild). If the mice do not demonstrate aggressive behavior (e.g. biting etc), after the recovery period they will again be group-housed.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

To relieve the pain associated with the surgery, analgesia will be given just before starting the surgery and, depending on the observed discomfort of the animals, up to 7 days after experimental stroke induction. To select proper analgesia, veterinarians and animal technicians will be consulted.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

All mice will experience (mild) discomfort from stressors (e.g. handling, individual housing, motor and behavioral testing) associated with the different experiments outlined in section 2A (general design). Furthermore, despite proper post-operative care and the relative mild nature of the stroke induced, several adverse effects of the experimental stroke are to be expected. For example, stroke induction will result in neurological deficits, such as forelimb weakness and incessant circling to the affected side. In AD mice these neurological deficits may be more severe. Furthermore, modelling AD in mice often makes these animals more sensitive to (the aforementioned) stressors, resulting in side-effects such as seizures [1]. Inducing stroke in these models is expected to increase these adverse (stress-related) side-effects. These side-effects in turn are expected to increase mortality rates, especially in stroke-induced AD mice. Finally, adverse effects of the anaesthetics, e.g. isoflurane, may also be expected. These may include respiratory depression and a decrease in blood pressure.

1. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

Explain why these effects may emerge.

Modelling AD in mice often results in increased sensitivity to stress due to the pathological accumulation of amyloid β in the brains of these mice. Induction of experimental stroke can be considered stressful and will furthermore impair a part of the brain due to ischemia, thus resulting in neurological and/or behavioural deficits. Combining both pathologies in AD mice is expected to increase the vulnerability of these mice in particular.

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

To minimize (stress-related) adverse side-effects and mortality, we have chosen an MCAO technique that is relatively non-invasive (no opening of the skull). Furthermore, both MCAO and neuroimaging will be practiced and the least stressful behavioural and neurological tests (based on literature) will be chosen. When possible, mice will be habituated to tools and procedures. Our extensive experience with AD mouse models should further minimize any stress resulting from for example housing conditions or handling. During anaesthesia, heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. If any detrimental effects of anaesthesia are observed, the level of anaesthesia will be rapidly adjusted. When necessary, humane endpoint sacrifices will be performed.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The animals will be prematurely euthanized if during MCAO surgery a decrease in regional cerebral blood flow (rCBF) of >80% of baseline is not reached (Note that a rCBF decrease of >80% during surgery is indicative of successful stroke induction). During the recovery period humane endpoints will be reached when 1) the animal stops eating or drinking, 2) body weight drops over 15% in two days or decreases >20% from its initial weight, 3) severe circulatory or breathing problems occur and/or 4) severe and persistent wound bleeding or infection occurs. Abnormal behavior and motor skills are to be expected, but if 35 days after MCAO surgery animals show only 50% motor activity, they will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

Estimated likely incidence of humane endpoints:

- Euthanization when rCBF reduction of >80% is not reached: 5% (MCAO groups)
- Euthanization during recovery period: 0-5% (highest incidence expected with MCAO, lowest with Sham)

Thus, 5-10% of the total expected mortality rates (Sham: 0% in wild-types, 10% in AD mice; MCAO: 35% in wild-types, 60% in AD mice) can be explained by humane endpoints, the remainder may be attributed to unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage; 25%) and/or AD pathology (5-25%).

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

Practicing the experimental stroke procedure (under anaesthesia) is classified as non-recovery. During the actual experiment, the level of discomfort associated with inducing mild experimental stroke under anaesthesia with recovery can be classified as moderate. This procedure is imperative to the design of the study and therefore cannot be avoided. Each neuroimaging paradigm (under anaesthesia) can be considered mildly discomforting as are all the individual behavioural and coordination tests. To assess general health, several mildly discomforting procedures (handling, weighing etc) will to be performed. Half of the mice will model AD by depositing amyloid β protein in their brain, a pathology than gives these mice additional mild discomfort mainly due to the mild epileptic seizures that are associated with the stress-sensitivity of AD mice. We expect these seizures, that will mostly be so small that they are hardly discernable, to occur in >50% of AD mice. The induction of mild stroke is expected to exacerbate the discomfort associated with AD pathology by for example prolonging seizure duration and/or increasing the number of small seizures. Discomfort due to AD pathology in stroke-induced AD mice is therefore expected to be moderate.

Combining the above-mentioned discomfort levels and taking the duration of the experiment into account, we expect the overall level of discomfort to be classified as 'moderate' (all wildtype mice and sham-operated AD mice; 60%) and 'severe' (AD mice with MCAO; 40%). Mice will be given ample time to recover from each moderate procedure before undergoing another procedure at this level of discomfort. The final neuroimaging paradigm will be non-recovery (terminal under anaesthesia).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Immediately after the last neuroimaging paradigm the mice will be sacrificed to study stroke lesion size, amyloid beta deposition and other relevant molecular markers (e.g. inflammation) in the brains of these mice.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="622 847 815 868">Serial number</th> <th data-bbox="1352 847 1697 868">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 879 640 900">2</td> <td data-bbox="1352 879 1951 935">Acute effects of [REDACTED] diet on mixed dementia parameters</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Acute effects of [REDACTED] diet on mixed dementia parameters
Serial number	Type of animal procedure					
2	Acute effects of [REDACTED] diet on mixed dementia parameters					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

With the animal procedures described in this appendix, we aim to investigate the acute effect of treatment with a [REDACTED] diet on mixed dementia cognitive impairment and neuroimaging parameters. Due to the large number of variables that will be addressed in the animal procedures described in this appendix (e.g. stroke, AD, diet, neuroimaging, cognition etc.), we have decided not to use both sexes simultaneously in this component of our project. We will first perform the experiment described in this appendix using male mice. When we see beneficial effects in males, we will also perform the experiment in female mice.

The set-up of the proposed animal procedures will be similar to an as yet unpublished experiment performed by us using wildtype mice (+experimental stroke, [REDACTED] diet). Male mice were used in this previous study, therefore to make comparisons we will also start the current experiment with males. We will induce mild experimental stroke (MCAO) in mice transgenic for amyloid precursor protein (APP)(AD mouse model) and wildtype controls and then feed half of the mice with a [REDACTED] diet containing ingredients such as specific phospholipids and vitamins that may contribute to brain repair. The other half of the mice will be fed a control diet (similar to standard rodent chow) with similar caloric values (isocaloric) as the [REDACTED] diet.

As a primary outcome parameter, we will collect behavioural data. Not only are cognition and motor skills known to be affected by both AD and (experimental) stroke, these skills can be attenuated by dietary intervention. It remains to be investigated what effect a [REDACTED] diet has on mixed dementia. To evaluate behavioural parameters, such as learning and memory, many well-described and highly recognized cognitive tests are available for mice.

As a secondary outcome parameter of these animal procedures, neuroimaging data will be collected to determine if a [REDACTED] treatment can enhance brain network recovery and brain circulation. Imaging the brain is a non-invasive way to assess brain function and structure during life and is therefore the best tool to assess these parameters. Collecting neuroimaging data will furthermore allow for a comparison with the mice used in the animal procedures described in appendix 1.

In summary, the general design of the actual experiment is as follows:

1. Measuring physiological parameters and assessing baseline motor skills (coordination tests)
2. Behavioural experiment measuring baseline cognition
3. Inducing mild experimental stroke by transient MCAO and switching to a multi-nutrient or isocaloric control diet (followed by at least one week of recovery)
4. Coordination tests and physiological parameters (immediately after recovery)
5. Neuroimaging paradigm (about two weeks after MCAO)
6. Behavioural and coordination tests (about 1½ months after neuroimaging)

7. Neuroimaging paradigm and sacrifice (about 2 months after MCAO)

For practical reasons, a maximum of 25 animals can be handled at one time in the behavioural experiment measuring baseline cognition. Therefore, the total number of mice needed to obtain statistically relevant data will be subdivided in at least three subgroups per sex.

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

We will first perform these experiments in male mice. When effects are found in males, the same experiment will also be performed in female mice.

A few weeks before experimental stroke induction, mice are moved to the animal facility where behavioural tests and neuroimaging will be performed [redacted] and acclimatized for at least one week. At this time, mice will be fed with control diet (similar to regular rodent chow). As motor skills will be affected by stroke induction, 2-4 motor tests will be performed prior to stroke induction (assess baseline motor skills). We will choose tests similar to the ones performed in appendix 1 (e.g. Pole test, Corner test and Grip test) as well as one or two more strenuous motor tests that have been performed in previous MCAO studies (e.g. Rotarod). One cognition test, such as the Barnes or Morris water maze, will be performed in one of the weeks prior to stroke induction to assess baseline cognition (learning/memory). Furthermore, right before experimental stroke induction, baseline physiological parameters (e.g. body weight etc.) will be registered to monitor the health of the animals.

Transient mild experimental stroke, resulting in focal ischemia, will be induced in mature transgenic AD mice and age-matched wildtype controls (e.g. littermates) by occluding the middle cerebral artery (MCAO) under general, adequate anaesthetics for a maximum of 30 minutes. MCAO is a well-described and robust technique to induce experimental stroke in mice [1]. To estimate occlusion success, cerebral blood flow will be monitored during surgery using Laser Doppler Flow. After surgery, all mice are individually housed and half of the mice will be switched from a control diet to a [redacted] diet while the other half remains on the (isocaloric) control diet (similar to regular rodent chow). The animals will be kept on these diets for the remainder of the experiments. Mice are allowed to recover from the MCAO for at least one week. During the recovery period, physiological parameters will be carefully monitored and proper analgesia will be given to reduce any discomfort or pain. Immediately after the recovery period, expected neurological deficits, such as forelimb weakness and circling to the affected side, will be determined and the aforementioned motor tests (e.g. Rotarod, Pole test, etc) will be performed to assess the success of the MCAO.

About two weeks after the MCAO, neuroimaging experiments will be performed to measure parameters such as lesion size (diffusion weighted imaging; DWI), neuronal connectivity ([redacted]) and cerebral blood flow (arterial spin labelling; ASL). For neuroimaging, mice are anaesthetised using isoflurane via inhalation. During the neuroimaging experiments, physiological parameters such as heart rate and body temperature are closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. The entire neuroimaging paradigm ([redacted]) will take a maximum of 2 hours per mouse, after which mice are allowed to awake and recover.

Two to four weeks after neuroimaging, potential motor abnormalities and behavioural and cognitive deficits will be assessed in the aforementioned motor tests (e.g. Rotarod, Pole test and Corner test) and behavioural tests such as open field or the Barnes or Morris water maze. Similar behavioural tests have been performed in previous studies exploring the effects of ischemia in AD mouse models. We have also performed such tests in our previous study exploring the effect of [redacted] diet in wildtype mice with experimental stroke (unpublished data). Therefore, these tests

will allow for a comparison of our study with these previous studies. In total, these tests may take up to two weeks to perform. A few days after the last behavioural test has been performed, the aforementioned neuroimaging paradigm will be performed once more. Immediately after these scans, mice will be sacrificed without arousal from the anaesthesia.

References

1. Macrae, I.M., *Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1062-78.

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

G*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ($P < 0.05$; Power: 0.80). To estimate effect size (d), comparable studies previously performed by us and described in literature are explored. Furthermore, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. The composition of the [REDACTED] diet will also be carefully chosen based on previous experiences with these type of diets. To assess the effects of MCAO, we gave chosen to test cognition before and after stroke induction and comparing the brain structure of contra- and ipsilateral sides of the same brain, thus minimizing the number of (control) animals needed. Randomly assigning mice to the control diet and [REDACTED] diet groups and treating and housing both groups similarly, should also contribute to minimizing group sizes.

B. The animals

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

Species: For several reasons, we will use mice (*Mus musculus*) for our project. Not only is AD mostly modeled in mice, stroke induction is also well-validated in this species. Furthermore, on a more practical note, the [REDACTED] we will use for neuroimaging is only accessible to mice. We are highly experienced working with mice and have studied the effects of [REDACTED] diet in mice before, allowing for comparisons with these previous mouse studies.

Origin: 'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen'

Estimated numbers: Based on the power analysis and taking the expected mortality rates with MCAO in wildtype (~35%) and AD mice (~60%) into account, we expect to need at least 120 mice (males only) and a maximum of 240 mice (males and females) (40% wildtype and 60% AD mice; 50% on control diet and 50% on [REDACTED] diet) for the experiment. Mortality rates are based on previous experiments (e.g. [1]) and may be the result of unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage) and/or, in case of seizure-prone AD mice [2], prolonged seizing. We will start the experiment with 120 male mice and optionally also perform it with 120 more female mice. With this total number of mice we expect to ultimately, after MCAO-related mortality, end up with the required number of mice to obtain statistically relevant data in both sexes (n~ 14-15 per experimental group).

Life stages: The level of AD pathology, rather than aging, is leading in choosing the suitable life stage of the mice. For the experiment described in this appendix, we will induce mild experimental stroke in mature adult mice with AD pathology, as these mice have AD-associated impairments (representing advanced stage of AD), thus allowing us to monitor dietary effects on both AD- and stroke-related (cognitive) impairment.

1. Kemppainen, S., et al., *Behavioral and neuropathological consequences of transient global ischemia in APP/PS1 Alzheimer model mice*. Behav Brain Res, 2014. **275**: p. 15-26.

2. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse	'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen'	240	mature adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: To study the complex interaction of both stroke and AD on brain structure and function and study the effect of diet on these parameters and cognition, it is not possible to use relatively simple animals or *in vitro* models. We have chosen mice as these animals are 1) the most commonly used to model the pathology of AD (i.e. amyloid β deposition) and 2) they are, with rats, the only animals where MCAO is performed to experimentally induce stroke. Mice furthermore allow us to study stroke and AD-related behavioural and neurological deficits and the effect of diet on these parameters, parameters that cannot be studied *in vitro*.

Reduction: This experiment cannot be performed with less animals, as the chosen numbers have been carefully calculated to obtain statistically relevant results while taking a high expected mortality rate, as a result of the MCAO and the development of AD, into account. Furthermore, as previously mentioned, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. The experience gained from performing MCAO and neuroimaging in appendix 1 should also lower mortality rates in this experiment. The composition of the [REDACTED] diet will also be carefully chosen based on our previous experiences with these types of diets.

Refinement: There are currently no other techniques available to model ischemic stroke with less discomfort to the mice than the MCAO technique we will use. However, several measures will be taken to minimize pain and distress of the animals. For example, experimental stroke will be induced using standard operating methods and under general anesthetics. We will furthermore use a relatively non-invasive method of MCAO (e.g. no opening of the skull) and use occlusion tools that insure high reproducibility of the lesion size in different mice. To optimize the success rate, mild experimental stroke induction will furthermore be performed in close collaboration with expert researchers in the field. Neuroimaging experiments will also be performed under anaesthesia to minimize distress and the least stressful behavioural and neurological tests (based on literature) will be chosen. When possible, mice will be habituated to tools and procedures to further minimize stress levels. Based on previous experiments, we do not expect any discomfort as a result of the [REDACTED] diet.

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

To minimize animal suffering, pain and fear the most distressing and painful procedures will be performed by experienced technicians/researchers. Furthermore, general anaesthesia and optimal post-surgery care, including analgesia, will be given. Only after a suitable recovery period will further animal procedures be performed. When possible, mice will be habituated to any tools or procedures that may be considered stressful to the animals, including certain behavioural setups (e.g. Pole test, Open field).

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable (not legally required)

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

After the occlusion, the animals will be individually housed to optimize healing of the surgical wound and better monitor physiological parameters and stroke-related abnormalities (e.g. abnormal motor function). As individual housing is also necessary to accurately measure consumption of the diet by each mouse, mice will not be group-housed after the recovery period (unlike appendix 1). Female mice in particular will experience discomfort as a result of the individual housing (severity: mild).

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

To relieve the pain associated with the surgery, analgesia will be given just before starting the surgery and, depending on the observed discomfort of the animals, up to 7 days after experimental stroke induction. To select proper analgesia, veterinarians and animal technicians will be consulted.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

All mice will experience (mild) discomfort from stressors (e.g. handling, individual housing, motor and behavioral testing) associated with the different experiments outlined in section 2A (general design). Furthermore, despite proper post-operative care and the relative mild nature of the stroke induced, several adverse effects of the experimental stroke are to be expected. For example, stroke induction will result in neurological deficits, such as forelimb weakness and incessant circling to the affected side. In AD mice these neurological deficits may be more severe. Furthermore, modelling AD in mice often makes these animals more sensitive to (the aforementioned) stressors, resulting in side-effects such as seizures [1]. Inducing stroke in these models is expected to increase these adverse (stress-related) side-effects. These side-effects in turn are expected to increase mortality rates. Finally, adverse effects of the anaesthetics, e.g. isoflurane, may also be expected. These may include respiratory depression and a decrease in blood pressure.

1. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

Explain why these effects may emerge.

Modelling AD in mice often results in increased sensitivity to stress due to the pathological accumulation of amyloid β in the brains of these mice. Induction of experimental stroke can be considered stressful and will furthermore impair a part of the brain due to ischemia, thus resulting in neurological and/or behavioural deficits. Combining both pathologies in AD mice is expected to increase the vulnerability of these mice in particular.

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

To minimize (stress-related) adverse side-effects and mortality, we have chosen an MCAO technique that is relatively non-invasive (no opening of the skull). As a result of the experiments of appendix 1, we will be experienced in performing both MCAO and neuroimaging. Our extensive experience with AD mouse models should further minimize any stress resulting from for example housing conditions or handling. When possible, mice will be habituated to tools and procedures. During anaesthesia, heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. If any detrimental effects of anaesthesia are observed, the level of anaesthesia will be rapidly adjusted. When necessary, humane endpoint sacrifices will be performed.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The animals will be prematurely euthanized if during MCAO surgery a decrease in regional cerebral blood flow (rCBF) of >80% of baseline is not reached (Note that a rCBF decrease of >80% during surgery is indicative of successful stroke induction). During the recovery period humane endpoints will be reached when 1) the animal stops eating or drinking, 2) body weight drops over 15% in two days or decreases >20% from its initial weight, 3) severe circulatory or breathing problems occur and/or 4) severe and persistent wound bleeding or infection occurs. Abnormal behavior and motor skills are to be expected, but if 35 days after MCAO surgery animals show only 50% motor activity, they will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

Estimated likely incidence of humane endpoints:

- Euthanization when rCBF reduction of >80% is not reached: 5%
- Euthanization during recovery period: 0-5%

Thus, 10% of the total expected mortality rates (35% in wild-types, 60% in AD mice) can be explained by humane endpoints, the remainder may be attributed to unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage; 25%) and/or AD pathology (25%).

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

During the experiment, the level of discomfort associated with inducing mild experimental stroke under anaesthesia with recovery can be classified as moderate. This procedure is imperative to the design of the study and therefore cannot be avoided. The individual behavioural and coordination tests can be considered mildly discomforting as is the neuroimaging paradigm (under anaesthesia). To assess general health, several mildly discomforting procedures (handling, weighing etc) will to be performed. Half of the mice will model AD by depositing amyloid β protein in their brain, a pathology than gives these mice additional discomfort mainly due to the mild epileptic seizures that are associated with the stress-sensitivity of AD mice. The induction of mild stroke is expected to exacerbate the mild discomfort associated with AD pathology (expected in >50% of AD mice) by for example prolonging seizure duration and/or increasing the number of small seizures. Discomfort due to AD pathology in the stroke-induced AD mice is therefore expected to be moderate. Finally, the change of diet can be considered mildly discomforting (50% of mice).

Combining the above-mentioned discomfort levels and taking the duration of the experiment into account, we expect the overall level of discomfort to be classified as 'moderate' for all mice. The final neuroimaging paradigm will be non-recovery (terminal under anaesthesia).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Immediately after the last neuroimaging paradigm, the mice will be sacrificed to study stroke lesion size, amyloid beta deposition and other relevant molecular markers (e.g. inflammation) in the brains of these mice.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0079
2. Titel van het project: Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease.
3. Titel van de NTS: De gevolgen van een herseninfarct op de ziekte van Alzheimer – een dieet interventie en hersenscan studie in muizen.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 22-05-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-06-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-06-2015 tot 23-06-2015 en van 13-07-2015 tot 20-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 23-06-2015 en 20-07-2015
 - advies aan CCD: 27-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-06-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Project Proposal:**
 - -3.1 De onderzoekers classificeren hun projectaanvraag als translationeel onderzoek. De commissie is niet overtuigd van de validiteit van dit diermodel voor de humane situatie. De strokes bij Alzheimer patiënten zijn kennelijk dermate klein dat zij vaak onopgemerkt blijven, bij de Alzheimer muizen wordt een dermate groot infarct geïnduceerd dat 60% van de dieren

dit niet overleeft. Kunnen de onderzoekers uitleggen waarom zij dit model relevant achten voor Alzheimer patiënten? Is er sprake van face, predictive, content of construct validity ?

- De commissie besluit eerst uw antwoord op deze vraag af te wachten alvorens zij de rest van de projectaanvraag nader bestudeert.
- Datum antwoord: 23-06-2015
- Strekking van het antwoord:
- Wij betreuren het dat onze aanvraag kennelijk niet duidelijk genoeg is geweest, waardoor de relevantie van ons diermodel niet gezien wordt. Wij hopen bij deze meer duidelijkheid te verschaffen op dit punt. Ten eerste erkennen wij dat de door ons geschatte 60% uitval bij de Alzheimer muizen met stroke inderdaad aanzienlijk is. Echter, zoals wij hebben aangegeven in beide appendices, onder andere bij punt B ('estimated numbers'), zal deze hoge mortaliteit bij de Alzheimer muizen in grote mate inherent zijn aan de gevoeligheid van deze muizen voor epileptische aanvallen (zie referentie 2 bij punt B). Wij schatten de uitval als gevolg van deze aanvallen op 25%. Daarbij schatten wij, op basis van onze eigen ervaring met deze techniek, de uitval als gevolg van de inductie van de stroke (door bijv. onverwachte bloedingen), ook op ongeveer 25%. Nog eens 10% van de uitval zal samenhangen met de humane eindpunten. Kortom, opgeteld verwachten wij met name bij de Alzheimer muizen een hoge uitval van 60% die echter niet één op één samenhangt met de grootte van het geïnduceerde infarct. Bovenstaande beschrijving van de door ons geschatte mortaliteitspercentages staat ook vermeld bij punt J ('likely incidence of humane endpoints') van de appendices.

Wat betreft de daadwerkelijke grootte van het door ons te induceren infarct, de experimental stroke die wij willen induceren wordt juist beschouwd als een milde stroke, gezien de korte duur van de occlusie. Gangbare tijdsduur van occlusie is 30 tot 120 minuten (zie referentie 13 in de project proposal), resulterend in modellen voor milde tot ernstige stroke. Wij willen in ons project een occlusie van hooguit 30 minuten toepassen, om zo het ongerief bij onze Alzheimer muizen te beperken en langdurige overleving te bevorderen. Kortom, onze muizen zullen een betrekkelijk klein, maar wel detecteerbaar, infarct krijgen. Om één en ander in de aanvraag te verduidelijken wat betreft ons model, hebben wij nu een korte beschrijving van stroke muismodellen toegevoegd aan punt 3.1 van de project proposal. Bij verwijzingen naar de experimental stroke bij de muizen geven wij nu bovendien aan dat dit een milde stroke betreft van maximaal 30 minuten (en dus niet meer 30-60 minuten, zoals vermeld in de oorspronkelijke aanvraag).

Hoewel bij de ziekte van Alzheimer (cerebro)vasculaire aandoeningen zoals microinfarcts of microbleeds ('small vessel disease') inderdaad een grote rol spelen, hebben wij nooit de indruk willen wekken dat alleen onopgemerkte infarcten een rol spelen bij stroke-gerelateerde Alzheimer. Bij deze vorm van dementie komen namelijk waarneembare infarcten ook zeker voor. Kortom, ook het milde infarct dat wordt geïnduceerd in ons model weerspiegelt wel degelijk een type infarct dat bij patiënten wordt waargenomen. Het is wat ons betreft dan ook zeker een geschikt model om de interactie tussen cerebrovasculaire ziekten en de ziekte van Alzheimer, een mengbeeld dat bij Alzheimer patiënten veelvuldig voorkomt, te onderzoeken. We hebben nu geprobeerd om de rol van waarneembare strokes duidelijker naar voren te laten komen in de aanvraag.

Graag willen wij hier nog benadrukken dat wij gebruik zullen maken van (een combinatie van) goed beschreven en alom gebruikte modellen voor zowel de ziekte van Alzheimer als

stroke. Zo is de occlusie van de middle cerebral artery, zoals wij die willen uitvoeren bij onze muizen, de meest gangbare methode om een model voor humane stroke te creëren. En, hoewel onze vraagstelling uniek is, zijn wij daarbij ook niet de eersten die stroke opwekken bij Alzheimer muizen (zie referenties 14-16 van de project proposal). Al met al menen wij dat er, gezien het feit dat ons model relevante etiologische en pathofysiologische aspecten van de humane condities nabootst, zeker sprake is van face en construct validity.

- Datum: 13-07-2015
- Strekking van de vragen:
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP 1 en 2, onderdeel B: Er is erg veel uitval van dieren, vooral bij de AD muizen. De onderzoekers schrijven dat dit in 25% van de dieren komt door epileptische aanvallen. Kunnen de onderzoekers aangeven wat het ongerief is dat gepaard gaat met de ernstige epileptische aanvallen? Welk percentage van de AD-dieren heeft epileptische aanvallen waar ze niet aan overlijden, en welke mate van ongerief ervaren deze dieren? In welke mate draagt de inductie van de stroke bij aan het optreden van aanvallen? De onderzoekers worden verzocht de inschatting van het ongerief voor de AD-muizen hier uitvoerig toe te lichten en te verwerken bij onderdeel K.
- Datum antwoord: 23-06-2015
- **Description of Animal Procedures, onderdeel B:**
- Zoals was vermeld bij onderdeel J van beide appendices, schatten wij de uitval als gevolg van de AD pathologie (A β depositie) bij de transgene muizen mét stroke inderdaad op 25%. Ook in de transgene muizen waar geen stroke wordt geïnduceerd verwachten wij uitval gerelateerd aan AD pathologie, maar deze schatten wij lager in, namelijk op 5-10%. Wij hebben nu dan ook in onderdeel J ('likely incidence') van appendix 1, waarin het gebruik van AD muizen zonder MCAO wordt beschreven, de uitval als gevolg van AD pathologie genuanceerd naar 5-25%. Wij verwachten hierbij inderdaad dat de AD-gerelateerde uitval in de transgene muizen met name het gevolg zal zijn van epileptische aanvallen. Deze aanvallen zijn een bekende bijkomstigheid van de accumulatie van A β in AD muismodellen (zie de referentie genoemd bij onderdeel I), waarbij het vermelden waard is dat ook bij de mens het risico op dergelijke aanvallen hoger is bij AD patiënten dan bij gezonde controles. Wat ons betreft draagt de aanwezigheid van epileptische aanvallen bij AD muizen dan ook bij aan de translationele waarde van het model.
Wat betreft het ongerief geassocieerd met de epileptische aanvallen bij AD muizen, is het onze ervaring dat de aanvallen over het algemeen zeer klein en kortdurend zijn (enkele seconden) en dat de muis hier niet of nauwelijks last van heeft. Wij zouden het ongerief van deze aanvallen in onbehandelde AD muizen dan ook als mild classificeren. Door blootstelling aan stressoren kan een aanval langdurig worden, wat het ongerief van de dieren verhoogt en de dood van de muis tot gevolg kan hebben. Wij verwachten dat dergelijke langdurige epileptische aanvallen meer zullen voorkomen in de AD muizen waarbij een stroke is geïnduceerd, wat maakt dat wij de uitval als gevolg van AD pathologie bij deze dieren zo'n 20% hoger inschatten en het ongerief van de epileptische aanvallen inschatten als 'moderate' in plaats van 'mild'. Deze toelichting is als gevraagd toegevoegd aan onderdeel K. Een inschatting geven van het percentage AD muizen dat een kortdurende of langdurige aanval krijgt, maar daar niet aan overlijdt, is lastig aangezien veel aanvallen onopgemerkt

zullen blijven. Eén en ander zal ook afhangen van het te gebruiken AD muismodel en de leeftijd van de muizen. Zo is onze ervaring met APPswe/PS1dE9 muizen dat zowel het aantal aanvallen als de uitval na een leeftijd van 5 maanden oud sterk afneemt, maar dit zal niet voor elk model gelden. Op basis van eerdere studies, waaronder de studie waarnaar wij refereren bij onderdeel I, verwachten wij dat, ongeacht het gekozen model of de leeftijd, bij >50% van de AD muizen een epileptische aanval kan plaatsvinden. Ook dit gegeven hebben wij toegevoegd aan onderdeel K van de appendices.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to study the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the AD brain to a) find novel (sex-specific) neuroimaging markers and/or predictors for mixed dementia and b) further elucidate (sex-specific) pathophysiological mechanisms linking stroke and AD' en 'investigate the effect of a [REDACTED] [REDACTED] diet on stroke- and AD-related cognition and brain network integrity'. Wetenschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat het meer inzicht kan verschaffen in de implicaties van een herseninfarct voor hersenstructuur en –functie, cognitie en gedrag voor beide sexen in een muizenmodel voor de ziekte van Alzheimer. Voorts wordt duidelijk of een [REDACTED] [REDACTED] dieet het verloop van de ziekte – al dan niet in combinatie met een herseninfarct - kan beïnvloeden. Dit onderzoek is ook maatschappelijk van belang, omdat de resultaten op termijn kunnen leiden tot de ontwikkeling van (sexe-specifieke) diagnostiek en/of geïndividualiseerde therapie voor mensen met de ziekte van Alzheimer. De ziekte van Alzheimer is een invaliderende ziekte met een toenemende prevalentie in de bevolking. Betere behandelingen zouden resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen, en in kostenreductie door het terugdringen van invaliditeit. De realisatie van de genoemde doelstellingen vertegenwoordigt in de ogen van de DEC daarom een substantieel belang.
4. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC heeft uitvoerig stilgestaan bij de vraag of de gebruikte methode voor het aanbrengen van

herseneninfarcten bij de muizen een realistisch model is voor de herseneninfarcten die optreden bij Alzheimer patiënten, en waarvan verondersteld wordt dat ze bijdragen aan het ziektebeeld. De DEC is tot de overtuiging gekomen dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot betrouwbare uitspraken over het effect van een herseneninfarct bij muizen met een genetische aanleg voor de ziekte van Alzheimer en de mogelijke therapeutische werking van een multi-nutriënten dieet.

5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het induceren van een herseneninfarct, en de gevolgen daarvan voor de dieren in de daarop volgende maanden. De combinatie met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer verergert dit ongerief. De commissie heeft extra aandacht besteed aan het achterhalen van het werkelijke ongerief voor de muizen met een genetische aanleg voor de ziekte van Alzheimer en de invloed van die genetische aanleg op de impact van een herseneninfarct, om er zeker van te zijn dat dit onderzoek ethisch verantwoord is. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde operatie in als matig. Het ongerief als gevolg van de gedragstesten en het imageren schat de commissie in als licht. Het ongerief voor de dieren met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer die na het herseneninfarct gedurende lange tijd (6 tot 8 maanden) in het experiment blijven, schat de commissie in als ernstig. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is daarom terecht ingeschat als matig voor 80% van de dieren, en ernstig voor 20% van de dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Om het effect van herseneninfarcten op cognitie en gedrag te kunnen meten zijn proefdieren nodig die een voldoende complex gedragsrepertoire hebben.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De uitval, met name onder de dieren met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer waarbij een herseneninfarct wordt aangebracht, is in de loop van het experiment vrij hoog. Het betreft een lastige ingreep die niet altijd lukt. Ook is het van belang om in het traject na de ingreep strikte humane eindpunten te hanteren en dieren met complicaties op tijd uit de proef te nemen. Voor het grootste deel gaat het bij de dieren die uitvallen niet om dieren met ernstig ongerief. Het uitvalpercentage is gebruikelijk voor dit type model en is niet te wijten aan een gebrek aan technische vaardigheid van de onderzoekers. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren, waarbij rekening wordt gehouden met die uitval. Door de resultaten van de dieetinterventie bij mannelijke dieren af te wachten alvorens dit bij vrouwelijke dieren wordt bepaald, wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 470 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Het

herseneninfarct wordt op een naar verhouding weinig-invasieve manier en gedurende een zo kort mogelijke tijd aangebracht. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de implicaties van een herseneninfarct voor hersenstructuur en –functie, cognitie en gedrag voor beide sexen bij een muizenmodel voor de ziekte van Alzheimer. Voorts wordt duidelijk of een multi-nutrienten dieet het verloop van de ziekte – al dan niet in combinatie met een herseneninfarct - kan beïnvloeden. Het is aannemelijk dat dit onderzoek op termijn kan bijdragen aan het ontwikkelen van betere diagnostiek en therapie voor mensen met de Ziekte van Alzheimer. Het belang van de genoemde wetenschappelijke inzichten in de rol van herseneninfarcten bij de Ziekte van Alzheimer en van betere diagnostiek en geïndividualiseerde therapie voor mensen met deze ziekte acht de DEC substantieel, mede gezien de toenemende prevalentie van deze invaliderende ziekte.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt zullen worden matig ongerief ondervinden als gevolg van het herseneninfarct. Voor de dieren met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer die gedurende lange tijd gevolgd zullen worden (20% van de dieren) leidt dit tot ernstig ongerief. De commissie heeft extra aandacht besteed aan het achterhalen van het werkelijke ongerief voor de muizen met een genetische aanleg voor de ziekte van Alzheimer, om er zeker van te zijn dat dit onderzoek ethisch verantwoord is. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren. De experimenten komen qua design overeen met wat in het onderzoeksveld gebruikelijk is.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - o 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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



Centrale Commissie Dierproeven

7

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboudumc
[REDACTED]
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015234

Datum: 01-09-2015

Factuurdatum: 1 september 2015
Vervaldatum: 1 oktober 2015
Factuurnummer: 201570234
040823-461220
2015-0079
[REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015234	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015234

Bijlagen

2

Datum 01-09-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015234. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

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: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: UHD
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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: 28 september 2015
Geplande einddatum: 28 september 2020
Titel project: Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer
Titel niet-technische samenvatting: De gevolgen van een herseninfarct op de ziekte van Alzheimer een dieet interventie en
Naam DEC: RU Dec
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 31 augustus 2015

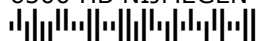


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015234

Bijlagen

2

Datum 01-09-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 september 2015

Vervaldatum: 1 oktober 2015

Factuurnummer: 201570234

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015234	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015234

26 SEP. 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease" met aanvraagnummer AVD103002015234. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease" starten. De vergunning wordt afgegeven van 28 september 2015 tot en met 27 september 2020. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning voor maximaal 5 jaar kan worden afgegeven. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU Dec gevoegd. Dit advies is opgesteld op 27 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 28 september 2015 tot en met 27 september 2020, voor het project "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease" met aanvraagnummer AVD103002015234, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU Dec.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 augustus 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 augustus 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 augustus 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 augustus 2015, ontvangen op 31 augustus 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Longitudinal effect of stroke and AD on neuroimaging and cognitive parameters	Muizen (Mus musculus) / wildtype en AD muizen	230	Ernstig / severe	
Acute effects of multi-nutrient diet on mixed dementia parameters	Muizen (Mus musculus) / wildtype en AD muizen	240	Matig / moderate	

Voorwaarden**Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen**

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2020 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de

doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 8 oktober 2015 10:59
Aan: [REDACTED]
CC: Info-zbo
Onderwerp: Terugkoppeling aanvraag AVD103002015234

Beste DEC,
Onlangs heeft u een advies uitgebracht aan de CCD betreffende aanvraag AVD103002015234, getiteld: "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease".

Namens de CCD bedank ik u voor dit heldere, goed onderbouwde advies. De CCD heeft uw advies gevolgd. Het project is vergund. De CCD heeft echter nog 2 algemene voorwaarden toegevoegd.

- 1) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.
- 2) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Deze e-mail is enkel bedoeld ter informatie.

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015239								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x	x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Mail aanvullende informatie DEC 1-10-2015				x		x	x	
11	Mail aanvullende informatie 2-10-2015				x		x	x	
12	Reactie aanvulling aanvraag				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Mail terugkoppeling DEC 14-10-2015				x		x	x	

15 SEP. 2015



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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10
Postbus	9101
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
IBAN	NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	Post-doctoral researcher	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 0 . 1 0 . 2 0 1 5
- Einddatum 1 0 . 1 0 . 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol van magnesium in diabetes type 2
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

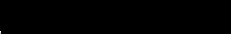
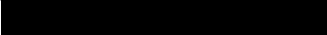
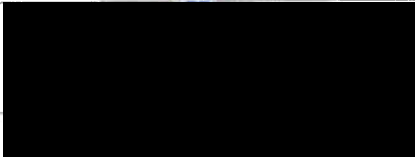
6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam 
 Functie 
 Plaats Nijmegen
 Datum 10 - 09 - 2015
 Handtekening 



**Form
Project proposal**

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3 Provide the title of the project.	The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures <input type="checkbox"/> Higher education or training
---	---

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

Globally, over 400 million people suffer from diabetes mellitus, mainly type 2 (DM2). DM2 is characterized by the combined defect of insulin resistance and deficiency. Patients suffering from diabetes mellitus often show hypomagnesaemia (serum magnesium (Mg²⁺) concentration <0.7 mmol/L). In literature the incidence of hypomagnesaemia in DM2 patients is described as being between 13.5 and 47.7%, **compared to 2.5-15% in the general population, indicating the severity and importance of hypomagnesemia in this disease.**(1) **In our cohort from DM2 patients from the Radboudumc, hypomagnesemia is observed in 30% of the patients.** Dietary Mg supplementation for patients with DM2 improves glucose metabolism and insulin sensitivity.(2) Moreover, it has been shown that DM2 patients with reduced serum Mg concentrations show a more rapid decline in renal function.(3) Despite these promising results serum Mg²⁺ values are still not routinely measured, and restored in case of deficiency, in DM2 patients in the clinics.

An instrumental organ in Mg²⁺ homeostasis is the kidney, as it regulates and fine-tunes urinary Mg²⁺ loss via reabsorption processes. In the distal convoluted tubule (DCT), the final urinary Mg²⁺ concentration is determined and here Mg²⁺ reabsorption is mediated via the apical epithelial Mg²⁺-channel Transient Receptor Potential Melastatin 6 (TRPM6). Recent evidence, [REDACTED], indicates that insulin increases TRPM6 channel abundance and activity. (4) Two novel SNPs (p.Val1393Ile and Lys1584Glu) in *TRPM6*, resulting in an impaired response of TRPM6 to insulin, have been identified. (4)

Magnesium on the other hand plays a key role in the activation and intracellular signaling of the insulin receptor.

Rats on a low magnesium diet have increased blood glucose levels and reduced autophosphorylation of the beta-subunit of the insulin receptor.(5) **Moreover, in another study it was showed that diabetic rats receiving magnesium supplementation had increased insulin and GLUT-2 mRNA expression compared to control-fed counterparts. (6) The importance of magnesium as a regulator of diabetes is also underlined by the fact that low magnesium intake is correlated with the development of DM2, and that magnesium-supplementation has beneficial effects on the disease development and progress in several small cohort studies. (2,7-9)As magnesium has an effect on the development and progress of diabetes and diabetes itself can induce a hypomagnesemia,** low serum magnesium may be both a cause and consequence of DM2, however this still needs to be further elucidated. Due to the lack of understanding of the

underlying mechanisms, magnesium is largely neglected by clinicians. With this proposal we will aim to further elucidate the mechanism underlying the effects of hypomagnesaemia in DM2 and raise awareness among clinicians for the importance of this ion in DM2.

A pilot experiment has already been initiated in which three different low-magnesium diets are given to mice for a period of 16 weeks ([REDACTED] [REDACTED]). This pilot will provide us with initial data about the optimal magnesium-concentration in the diet, side-effects of the diet and preliminary data regarding diabetes and ion homeostasis.

Besides hypomagnesaemia, also other electrolyte imbalances are observed in DM2 patients, namely in potassium, sodium, calcium and phosphate (10). Mainly potassium is an interesting ion in the scope of DM2 as it has been shown that low serum potassium is indicated with reduced insulin secretion, impaired glucose tolerance and reduced peripheral glucose uptake in tissues. Low potassium and low magnesium often coincide in diseases (such as Gitelman or Barter syndrome), due to the fact that low intracellular magnesium activates the potassium channel ROMK, resulting in increased renal excretion of potassium (11).

Hypokalaemia can occur in DM2 patients by exogenous insulin (which increases the uptake of potassium in muscle cells), by intestinal malabsorption or by a renal potassium leak.

1. Pham, P.C., et al., Hypomagnesemia in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007. 2(2): p. 366-73.
2. Rodriguez-Moran, M. and F. Guerrero-Romero, Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity and metabolic control in type 2 diabetic subjects: a randomized double-blind controlled trial. *Diabetes Care*, 2003. 26(4): p. 1147-52.
3. Pham, P.C., et al., Lower serum magnesium levels are associated with more rapid decline of renal function in patients with diabetes mellitus type 2. *Clin Nephrol*, 2005. 63(6): p. 429-36.
4. Nair, A.V., et al., Loss of insulin-induced activation of TRPM6 magnesium channels results in impaired glucose tolerance during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(28): p. 11324-9.
5. Suarez, A., et al., Impaired tyrosine-kinase activity of muscle insulin receptors from hypomagnesaemic rats. *Diabetologia*, 1995. 38(11): p. 1262-70.
6. Balon, T.W., et al., Magnesium supplementation reduces development of diabetes in a rat model of spontaneous NIDDM. *Am J Physiol*, 1995. 269(4 Pt 1): p. E745-52
7. Dong, J.Y., et al., Magnesium intake and risk of type 2 diabetes: meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Care*, 2011. 34(9): p. 2116-22.
8. Hruby, A., et al., Higher magnesium intake reduces risk of impaired glucose and insulin metabolism and progression from prediabetes to diabetes in middle-aged americans. *Diabetes Care*, 2014. 37(2): p. 419-27.
9. Song, Y., et al., Dietary magnesium intake in relation to plasma insulin levels and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*, 2004. 27(1): p. 59-65.
10. Liamis, G., et al., Diabetes mellitus and electrolyte disorders. *World J Clin Cases*, 2014. 2(10): p. 488-96.
11. Huang, C.L. and E. Kuo, Mechanism of hypokalemia in magnesium deficiency. *J Am Soc Nephrol*, 2007. 18(10): p. 2649-52

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
 - If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?
-

The aim of this project is to gain more insight in the mechanism of the development of hypomagnesaemia in Diabetes Mellitus type 2 (DM2). Our research group has great expertise in the field of renal ion handling. [REDACTED]

[REDACTED]

Our main goal of this project is to finally conclude whether low serum magnesium is a cause or consequence of DM2, or that both is the case. With the proposed experimental setup, we presume that after this study we will be able to make solid statements regarding this long-lasting debate. Moreover, by uncovering the molecular mechanism of hypomagnesaemia in DM2 we aim to increase awareness among clinicians to routinely measure magnesium and, if needed, give magnesium supplementation to DM2 patients.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

The cause of disturbances in serum magnesium, but also other ions (K⁺, Na⁺, Ca²⁺), in DM2 remains very poorly understood. Moreover, the effect that hypomagnesaemia has on the development and progression of DM2 on a molecular level remains to be elucidated. [REDACTED]. With this proposal we also aim to unveil the regulation of both magnesium and glucose homeostasis *in vivo*, resulting in invaluable knowledge in these fields.

Medical & Societal relevance

Diabetes affects approximately 400 million people worldwide and accounts for ± 15% of our health costs. Recent studies show that diabetes type 2 (DM2) patients with hypomagnesemia have a worse disease progression compared to their counterparts with normal serum magnesium levels. Despite this, magnesium is not routinely measured in DM2 patients in the clinic. By elucidating the mechanism by which hypomagnesaemia arises in DM2 patients we aim to increase awareness among clinicians to measure serum magnesium, and if needed, prescribe oral magnesium supplementation to DM2 patients. This could strongly reduce treatment costs and improve patient health in a simple and non-invasive manner

3.4 Research Strategy

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

- 1) We will start by testing the optimal magnesium concentration in a pilot experiment. [REDACTED]
In a subsequent experiment, mice will be subjected to either a normal or high-fat diet to induce obesity-induced diabetes. This diet will be combined with either a normal (**control**) or a low magnesium concentration (optimal concentration determined in the pilot experiment). The development and progress of the diabetes will then be monitored. Also the effect of diabetes on serum magnesium levels will be investigated.
- 2) In the second part of the study we want to investigate the effect of other dietary ion changes on diabetes development (diabetes model: high fat diet). The exact study setup is dependent on the results obtained in part 1, in which we looked at serum ion concentrations in diabetic mice. The concentration of ion in the diet will be determined by pilot experiments. Also, combined diets (e.g. high-fat + magnesium- and potassium-deficient diet) will possibly also be used. The effect of these diets on diabetes development and progress can then be more thoroughly investigated.
- 3) In the third part of the study we will use genetic mice models to study magnesium-homeostasis and the development of diabetes. By excising the pancreas post-mortem we can do ex-vivo stimulation studies on the Islets of Langerhans. Moreover, we can investigate differences in pancreas function between genetic mice on normal or magnesium-deficient diet. Depending on the results obtained in part 2, also other ions can be more thoroughly investigated.
We will use genetically modified mice as a model for diabetes in this part of the study, as these mice develop DM2 quicker and with less discomfort.
- 4) In the fourth part of the study we will again use diabetic mice (depending on the results from 1-3, this will be a high-fat or a genetic model). By intervening in the pathway involved in insulin signaling or magnesium-transport we want to investigate if we can influence the speed of diabetes development: speed it up, or slow it down; possibly partly rescuing the diabetes phenotype.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

To elucidate the mechanism of hypomagnesaemia in Diabetes Mellitus type 2 (DM2) we will use four different approaches

- 1) A diet mouse model for low magnesium in the progression of diet-induced DM2. In this study we will combine a high-fat diet with magnesium-deficient diets.
Using this approach we will be able to determine the importance of magnesium on the development of DM2. Also this allows us to study in depth the effect that magnesium and high fat have on the expression of ion-channels in the kidney, the expression of glucose channels in soft tissues and the insulin/glucose sensitivity of tissues.
A pilot for this study, using three different magnesium-deficient diets, has already been initiated.
- 2) Diet mouse models using different dietary ion contents. For instance using potassium-deficient or potassium-enriched diets in combination with magnesium-diets. As it has been shown that normal potassium serum levels are required in order to restore low magnesium serum levels to normal. This can then also be combined with a high-fat diet to investigate the effect on the development of DM2. If no data is known about the concentrations/side effects of certain ion-diets, pilot experiments will first be conducted.

3) Studying the effect of magnesium in genetic DM2 mouse models, such as *db/db* or *ob/ob* mice. We want to also isolate beta-cells from the pancreas of these mice. We can then perform *in vitro* experimentation, for instance stimulation of these cells in the absence or presence of magnesium.

4) To determine the exact molecular mechanism of magnesium and DM2 we want to intervene in the intracellular pathway. This will be done by injecting substances that act as inhibitors on proteins that are involved in the intracellular cascade of glucose- and magnesium handling. Also, we can try to rescue these mice by intervening in the intracellular pathway. The exact study design will be dependent on the results obtained in point 1-3.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

In part 1) of this study we aim to determine if low serum magnesium exacerbates the development and progression diabetes mellitus type 2 (DM2). Moreover, this study design enables us to investigate the effects on magnesium homeostasis resulting from the diabetes.

In part 2) of this study we go more deeply into the role of other ions (such as potassium and sodium) in the homeostasis of magnesium and in the development and progression of DM2. The exact combination of diets is partly dependent on the results obtained in part 1, in which we will determine effects on several ion-concentrations and ion-transporters. If no effects are observed (in part 1) on ion-levels or the expression of ion-transporters in the kidney, this part of the study will not be performed.

In part 3) of this study the effects of magnesium on the pancreas will be more thoroughly investigated using genetic diabetes mouse models. Depending on the results obtained in part 1 and 2, we will combine this genetic model with a magnesium-deficient diet. If part 1 and 2 contain mainly negative results, this extra diet intervention will not be performed.

In part 4) of this study we will use drug interventions by administering inhibitors to investigate the effects observed in part 1-3 on a more molecular level. Also we will use drug interventions to aim to rescue the mice.

The exact type of drug that will be used to target the intracellular insulinreceptor signaling cascade, or cascades involved in magnesium transport, will be decided by the results obtained in part 1-3.

Using these 4 strategies, we will elucidate the role of magnesium in DM2 from a molecular level to a translational level.

By clarifying the importance of magnesium in DM2 we hope to increase awareness among clinicians for the importance of this ion.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Magnesium deficiency in fat-induced DM2
2	Mouse models using different dietary ion contents
3	Magnesium deficiency in genetic DM2 models
4	Intervene in the intracellular cascade

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Magnesium deficiency in fat-induced DM2

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

To examine the effects of the magnesium availability on the development of DM2, we will feed adult mice a high-fat diet to mimic the onset of DM2 by a Western pattern diet and use normal fat concentrations as control groups. Diets will also be combined with either normal or low magnesium-concentrations to research the role of magnesium on the development and progress of DM2. [REDACTED]

Hence, the setup of diets might look like this:

- Normal fat + Low magnesium
- Normal fat + Normal magnesium
- High fat + Low magnesium
- High fat + Normal magnesium

To quantify the severity of diabetes, several outcome parameters will be investigated.

The primary outcome parameter is fasting glucose as measure for the progression of the DM2. Since development of diabetes is the main outcome of our experiments, we will use several other additional parameters to determine this. An important parameter being glycated HbA1c, as this parameter remains stable over a period of weeks (the lifetime of red blood cells). Other parameters include intraperitoneal insulin and oral glucose tolerance tests (widely used, standardized tests in diabetes animal studies that give information regarding insulin sensitivity/secretion), body weight, urine glucose (fasting), pro-inflammatory cytokines and the expression of GLUT2/GLUT4 in soft tissues.

To more thoroughly investigate the effect on magnesium homeostasis we will look at parameters such as serum and urine magnesium concentrations. This will show us the severity of hypomagnesemia in these mice.

We will also determine the expression of magnesium transporters in the intestines and kidney, as well as other transporters involved in renal ion homeostasis. There is great expertise in our department regarding this part.

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

Mice will be fed normal- or high-fat containing diets for a maximum period of 16 weeks, combined with different dietary magnesium concentrations. Before and during the animal experiments, the mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs per 2 weeks) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood will be collected by jugular vein puncture or tail vein puncture regularly (maximum 100µl / puncture and 1 puncture / 2 weeks). This will allow us to follow serum magnesium concentrations over time, as well as markers of diabetes and inflammation.

During the course of the experiment, mice will be subjected to intraperitoneal insulin tolerance test or oral glucose tolerance tests (maximum of 5 times in 16 weeks). These measurements contain an overnight fast (<12h) followed by intraperitoneal injection of insulin or a glucose bolus (2g/kg body weight) via orale gavage. Hereafter, in the subsequent two hours regular blood collection (at 15, 30, 60, 90, 120 minutes) will follow to measure serum glucose and insulin over time.

This procedure is standardized and widely used in the field of diabetes to investigate sensitivity to, and production of insulin. We also have a cooperation with a group who have great expertise with these techniques who will help us to correctly perform them.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

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

To study the effects of magnesium on the development of diabetes, and to study the effects of diabetes on the development of hypomagnesemia, we expect to use approximately 100 mice. Namely, 2 studies involving 40-50 mice, in which four groups of approximately 10 mice per group will be used. Each group will be given a different diet (normal/high fat, low/normal magnesium).

We are currently already running a pilot experiment for this study (██████████), therefore no additional animals are required for pilot-experiments in this part.

Before starting the experiment a power calculation will be performed using this formula:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

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

We will make use of adult mice (*mus musculus*), often of C57bl/6 background as our previous data are generated using this strain, making our results easy to compare to previous results. To study the factors involved in the etiology of diabetes the mouse is well-established in this field of research as it is sensitive for the development of diabetes by a high-fat diet. Mice will be ordered from commercial suppliers.

In total we will be using 100 mice for this part of the study. We will likely be using a setup of four different diets.

To study the effects of magnesium on the development of diabetes, and to study the effects of diabetes on the development of hypomagnesemia, we expect to use approximately 100 mice. Namely, 2 studies involving 40-50 mice, in which four groups of approximately 10 mice per group will be used. Each group will be given a different diet (normal/high fat, low/normal magnesium) resulting in the following groups:

- Normal fat, Low magnesium- Normal fat, Normal magnesium- High fat, Low magnesium- High fat, Normal magnesium

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Commercial supplier	100	6-15 week old, adult mice

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like diabetes, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*. Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, can not be mimicked in a lower animal species.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. Pilot studies have been performed (██████████) that provide good data on variation and effect size of the proposed magnesium diets. If necessary because not all information is available, a pilot study will be performed. Based on these calculation the minimum number of animals will be used for our experiments.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport

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

Animals will only be handled by experienced and skilled researchers/technicians.

Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired.

When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

F. Accommodation and care

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Mice will be housed in groups, except when the collection of urine and faeces is desired. Then mice will be placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Moreover, mice will be given a non-standard diet. Namely a synthetic diet with either normal or high fat content and normal or low magnesium concentrations.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Blood collection can be painful, but because of the stress and risk of death by anesthesia we will not use anesthesia, as is custom for blood collection.

As anesthesia influences glucose metabolism, no anesthesia will be administered for the insulin and glucose tolerance tests

[] Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice may suffer from adverse effects of the dietary intervention.

A high-fat diet can cause an oily fur and increase scratching of the skin, which can potentially result in inflammation and dermatitis. By monitoring the mice daily, we will make sure to exclude those mice from the study in a timely manner. The mice develop severe obesity (body weight can reach up to 60-70 gram). Therefore cage density will have to be taken into consideration. Moreover, diabetic mice tend to have increased urine production, which requires more frequent cage changes and extra absorbent bedding. Mice might also have a reduced core body temperature, due to reduced thermogenesis, and cannot adapt well to reduced room temperature. After 16 weeks, mice might have stage 1 chronic kidney disease due to the diabetes.

Mice develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional gnawing-material will be added to the cages

A magnesium-deficient diet can induce muscle cramps and potentially increase the risk of heart attack. These side effects are being investigated in a pilot study (██████████), which is currently being performed. After 8 weeks, no side-effects have currently been observed.

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include blood sampling, solitary housing (often in metabolic cage), fasting and glucose/insulin tolerance tests.

Explain why these effects may emerge.

- Obesity and Diabetes due to high-fat diet
- Possible muscle cramps/increased risk of heart attack due to magnesium-deficient diet
- Increased stress from solitary housing in metabolic cage
- Increased stress due to fasting & glucose/insulin tolerance tests
- Teeth problem due to the soft high-fat diet

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

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are housed in solitary. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Mice may develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional biting-material will be added to the cages. Mice on high-fat diet will develop obesity and diabetes. They can have increased urine production, therefore cages will be cleaned more regularly, more bedding material will be available and water bottles will be filled more frequently to ensure ad libitum access.

As obese mice have reduced core body temperature due to reduced thermogenesis, more nesting/bedding material will be available

To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like losing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.
3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment
4. (Reliable and applicable) results can not be achieved because of conditions not related with the experiment.
5. Specific humane endpoints for magnesium-deficient diet: visible muscle cramps, lack of movement, not able to hold on to the cage
6. Specific humane endpoints for high-fat diet: complete movement impairment, dermatitis, respiratory depression
7. The objective of the experiment has been reached.

The responsible researcher will contact the Animal Welfare Body (IvD) if criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the animal will not be taken out of the experiment.

If criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the responsible researcher is not available, an animal care taker or biotechnician or researcher has the obligation, (preferably after internal communication) to take the animal out of the experiment and euthanise it under general anaesthesia.

Indicate the likely incidence.

The incidence of endpoints by the magnesium-deficient diet is currently being investigated in a pilot experiment ([REDACTED]). Currently, the pilot is running for 8 weeks, where no adverse effects are observed in mice given a severe magnesium-deficient diet (0.02% magnesium). Therefore we expect the incidence of humane endpoints by magnesium-deficient diet to be <5%

The incidence of humane endpoints by a high-fat diet (usually by dermatitis) is approximately 5-10%, according to previous experiments using high-fat diets performed in our group

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Cumulative discomfort: moderate (due to the amount of mild procedures and 'double-diet': low ion + high fat)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The animals will be sacrificed to allow for the analysis of organs/tissues.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Mouse models using different dietary ion contents

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

It has been shown that patients with Diabetes Mellitus type 2 (DM2) have decreased serum magnesium levels which results in a worse disease progression compared to normomagnesemic DM2 patients. Also other electrolyte disbalances are observed in DM2 patients such as dysnatremia, dyskalemia, dyscalcemia and hypophosphatemia. It is known from other diseases that restoring a hypomagnesemia by oral magnesium supplementation requires a healthy serum potassium level. Moreover, potassium has its own potential effects on the development of diabetes. Hypokalemia is indicated with impaired insulin production and reduced peripheral glucose utilization by tissues. Also insulin could have an effect on potassium levels by increasing potassium uptake in skeletal muscle cells. However, the exact interplay between different ions (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+}) in diabetes disease development and progression remains to be elucidated.

To examine the effects of electrolyte availability on the development of DM2, we will feed adult mouse a high-fat diet to mimic the onset of DM2 by a Western pattern diet and use normal fat concentrations as control groups. Both fat diets will be contain different electrolyte contents (e.g. rich/deficient of potassium, rich/deficient in magnesium, rich/deficient in sodium or combinations of these) to establish the effect of magnesium on the development of DM2.

To quantify the severity of diabetes, several outcome parameters will be investigated. The primary outcome parameter is fasting glucose as measure for the progression of the DM2. Since development of diabetes is the main outcome of our experiments, we will use several other additional parameters to determine this. An important being glycated HbA1c, as this parameter remains stable over a period of weeks (the lifetime of red blood cells). Other parameters include intraperitoneal insulin and oral glucose tolerance tests (widely used, standardized tests in diabetes animal studies that give information regarding insulin sensitivity/secretion), body weight, urine glucose (fasting), pro-inflammatory cytokines and the expression of GLUT2/GLUT4 in soft tissues.

To more thoroughly investigate the effect on magnesium/potassium/sodium homeostasis we will look at parameters such as serum and urine ion concentrations. This will show us the blood ion state of these mice. We will also determine the expression of ion transporters in the intestines and kidney. There is great expertise in our department regarding this part.

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

Mice will be fed with normal- or high-fat containing diets for a maximum period of 16 weeks, combined with different dietary electrolyte concentrations. Before and during the animal experiments, the mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs per 2 weeks) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood will be collected by jugular vein puncture or tail

vein puncture regularly (maximum 100µl / puncture and 1 puncture / 2 weeks). This will allow us to follow serum magnesium concentrations over time, as well as markers of diabetes and inflammation.

During the course of the experiment, mice will be subjected to intraperitoneal insulin tolerance test or oral glucose tolerance tests (maximum of 5 times in 16 weeks). These measurements contain an overnight fast (<12h) followed by intraperitoneal injection of insulin or a glucose bolus (2g/kg body weight) via orale gavage. Hereafter, in the subsequent two hours regular blood collection (at 15, 30, 60, 90, 120 minutes) will follow to measure serum glucose and insulin over time.

This procedure is standardized and widely used in the field of diabetes to investigate sensitivity to, and production of insulin. We also have a cooperation with a group who have great expertise with these techniques who will help us to correctly perform them.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

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

The number of mice is based on a project duration of 5 years. Each individual experiment will include on average 40 mice to study diabetes (approximately 4 groups of 10 mice per study). Expectedly 4 experiments will be performed wherein different electrolytes will be investigated. Prior to these experiments, pilots will have to determine the optimal concentrations, and to investigate certain side-effects of the diet. For this we estimate to use 40 mice.

Therefore we need 200 mice for this part of the study.

Prior to any experiment a power calculation will be conducted using this formula:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

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

We will make use of adult mice (*mus musculus*), often of C57bl/6 background as our previous data are generated using this strain, making our results easy to compare to previous results. To study the factors involved in the etiology of diabetes the mouse is well-established in this field of research as it is sensitive for the development of diabetes by a high-fat diet. Mice will be ordered from commercial suppliers.

Each individual experiment will include on average 40 mice to study diabetes (approximately 4 groups of 10 mice per study). Expectedly 4 experiments will be performed wherein different electrolytes will be investigated. Prior to these experiments, pilots will have to determine the optimal concentrations, and to investigate certain side-effects of the diet. For this we estimate to use 40 mice. Therefore we need 200 mice for this part of the study.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Commercial supplier	200	6-15 week old adult mice

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like diabetes, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*. Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, can not be mimicked in a lower animal species.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. Pilot studies have performed () that provide good data on variation and effect size, for different electrolytes a literature search will be performed to obtain information on expected variation and effect size. If necessary, because not all information is available, a pilot study will be performed. Based on these calculation the minimum number of animals will be used for our experiments.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport

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

Animals will only be handled by experienced and skilled researchers/technicians.

Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired.

When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels.

When experiments will be performed with unknown side-effects, a pilot will be performed prior to the actual study.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Mice will be housed in groups, except when the collection of urine and faeces is desired. Then mice will be placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Moreover, mice will be given a non-standard diet. Namely a synthetic diet with either normal or high fat content and normal or low ion concentrations.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

H. Pain and pain relief

Blood collection can be painful, but because of the stress and risk of death by anesthesia we will not use anesthesia, as is custom for blood collection.

No anesthesia will be used for glucose/insulin tolerance tests as this influences glucose metabolism

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice may suffer from adverse effects of the dietary intervention.

A high-fat diet can cause an oily fur and increase scratching of the skin, which can potentially result in inflammation and dermatitis. By monitoring the mice daily, we will make sure to exclude those mice from the study in a timely manner. The mice develop severe obesity (body weight can reach up to 60-70 gram). Therefore cage density will have to be taken into consideration. Moreover, diabetic mice tend to have increased urine production, which requires more frequent cage changes and extra absorbent bedding. Mice might also have a reduced core body temperature, due to reduced thermogenesis, and cannot adapt well to reduced room temperature. After 16 weeks, mice might have stage 1 chronic kidney disease due to the diabetes.

Mice develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional gnawing-material will be added to the cages

A magnesium-deficient diet can induce muscle cramps and potentially increase the risk of heart attack. These side effects are being investigated in a pilot study, which is currently being performed.

A potassium-deficient diet can induce arrhythmia's, muscle weakness, tremor, muscle cramps and constipation. Literature search and potentially a pilot-experiment will have to determine the appropriate concentration of potassium in the diet.

No effects are expected from a potassium-enriched diet, as the concentration potassium in standard chow is already high. Side effects could include muscle weakness and sudden cardiac death.

Also no severe effects are expected in a low sodium diet. A high sodium diet could result in cardiovascular problems.

Before using any of these diets, thorough literature search and a potential pilot experiment will determine the optimal concentration and potential side-effects.

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include blood sampling, solitary housing (often in metabolic cage), fasting and glucose/insulin tolerance tests

Explain why these effects may emerge.

- Obesity and Diabetes due to high-fat diet
- Possible muscle cramps/weakness and increased risk of heart attack due to magnesium-deficient diet
- Possible arrhythmia's, constipation, muscle weakness and muscle cramps due to potassium-deficient diet.
- Increased stress from solitary housing in metabolic cage
- Increased stress due to fasting & glucose/insulin tolerance tests
- Teeth problem due to the soft high-fat diet

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

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are solitary housed. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels.

Mice may develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional gnawing-material will be added to the cages. Mice on high-fat diet will develop obesity and diabetes. They can have increased urine production, therefore cages will be cleaned more regularly, more bedding material will be available and water bottles will be filled more frequently to ensure ad libitum access.

As obese mice have reduced core body temperature due to reduced thermogenesis, more nesting/bedding material will be available.

To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians.

Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like losing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.
3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment
4. (Reliable and applicable) results can not be achieved because of conditions not related with the experiment.
5. Specific humane endpoints for ion-deficient diets: visible muscle cramps, lack of movement, not able to hold on to the cage, complete constipation.

6. Specific humane endpoints for high-fat diet: complete movement impairment, dermatitis, respiratory depression

7. The objective of the experiment has been reached.

The responsible researcher will contact the Animal Welfare Body (IvD) if criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the animal will not be taken out of the experiment.

If criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the responsible researcher is not available, an animal care taker or biotechnician or researcher has the obligation, (preferably after internal communication) to take the animal out of the experiment and euthanise it under general anaesthesia.

Indicate the likely incidence.

The incidence of endpoints by the magnesium-deficient diet is currently being investigated in a pilot experiment ([REDACTED]). Currently, the pilot is running for 8 weeks, where no adverse effects are observed in mice given a severe magnesium-deficient diet (0.02% magnesium). Therefore we expect the incidence of humane endpoints by magnesium-deficient diet to be <5%

The incidence of endpoints by the potassium-deficient/enriched diets will be investigated by literature search and possibly a pilot study.

The incidence of humane endpoints by a high-fat diet (usually by dermatitis) is approximately 5-10%, according to previous experiments using high-fat diets performed in our group

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Cumulative discomfort: moderate (due to the amount of mild procedures and 'double-diet': low ion(s) + high fat)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The animals will be sacrificed to allow for the analysis of organs/tissues.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Magnesium deficiency in genetic DM2 models

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

In this part of the study we want to investigate the role of magnesium in DM2 using a well established genetic diabetes mouse model. By putting the diabetic mice on standard or magnesium-deficient diets, we can determine the role of magnesium in the development of diabetes. Additionally, we will remove the pancreas of these mice (after sacrifice) to isolate the islets of Langerhans. These islets will then be used for *in vitro* assays such as stimulation in the presence or absence of magnesium. Also we can investigate if the pancreas of the diabetic mice on a hypomagnesemic diet responds different to stimulation compared to the pancreas of diabetic mice on normomagnesemic diet. In this part of the study, in which we will look specifically at the pancreas, it might not be needed to mimic exactly the development of diabetes as seen in humans (high-fat diet). Therefore we may use genetic mouse models for diabetes, which have less discomfort compared to high-fat diet mice. The discomfort in these mice is lower compared to high-fat diet mice as no soft high-fat chow is required (no teeth problems) and the genetically modified mice do not develop an oily skin (leading to dermatitis). Also the mice develop diabetes more quickly compared to the high-fat diet.

To quantify the severity of diabetes, several outcome parameters will be investigated.

The primary outcome parameter is fasting glucose as measure for the progression of the DM2. Since development of diabetes is the main outcome of our experiments, we will use several other additional parameters to determine this. An important being glycated HbA1c, as this parameter remains stable over a period of weeks (the lifetime of red blood cells). Other parameters include intraperitoneal insulin and oral glucose tolerance tests (widely used, standardized tests in diabetes animal studies that give information regarding insulin sensitivity/secretion), body weight, urine glucose (fasting), pro-inflammatory cytokines and the expression of GLUT2/GLUT4 in soft tissues.

To more thoroughly investigate the effect on magnesium homeostasis we will look at parameters such as serum and urine magnesium concentrations. This will show us the severity of hypomagnesemia in these mice.

We will also determine the expression of magnesium transporters in the intestines and kidney, as well as other transporters involved in renal ion homeostasis. There is great expertise in our department regarding this part.

Another important parameter in this part of the study is ex-vivo stimulation of pancreas under different magnesium-concentrations.

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

To investigate the role of magnesium in the Diabetes Mellitus type 2 (DM2) we will use a genetic mouse model of diabetes (e.g. *ob/ob* , *db/db* or others). The main focus of this part of the study is the pancreas.

To study the effects of magnesium on the pancreas of diabetic mice we will use different dietary magnesium concentrations.

Before and during the animal experiments, the mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs per 2 weeks) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood will be collected by jugular vein puncture or tail vein puncture regularly (maximum 100µl / puncture and 1 puncture / 2 weeks). This will allow us to follow serum magnesium concentrations over time, as well as marker of diabetes and inflammation.

During the course of the experiment, mice will be subjected to intraperitoneal insulin tolerance test or oral glucose tolerance tests (maximum of 5 times in 16 weeks). These measurements contain an overnight fast (<12h) followed by intraperitoneal injection of insulin or a glucose bolus (2g/kg body weight) via orale gavage. Hereafter, in the subsequent two hours regular blood collection (at 15, 30, 60, 90, 120 minutes) will follow to measure serum glucose and insulin over time. This procedure is standardized and widely used in the field of diabetes to investigate sensitivity to, and production of insulin. We also have a cooperation with a group who have great expertise with these techniques who will help us to correctly perform them.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

Another genetic model that will possibly be used is the genetically modified Kir6.2-V59M mice, which express an inducible, beta-cell specific Kir6.2-V59M mutation. These mice are normal until they are induced (by tamoxifen injection), which we will do at the age of 8-15 weeks. A few days after tamoxifen injection they develop blood glucose levels of ~25 mM. Mice are normally kept diabetic for no more than 5 weeks and during this period no loss of condition is observed. This inducible model can be used to investigate effects after the diabetes has already been fully developed.

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

The number of mice is based on a project duration of 5 years. To investigate the role of magnesium in genetic diabetes models and to determine the effects of magnesium on the pancreas of these mice we expect to use 40 mice per experiment (approximately 4 groups of 10 mice), in a total of 3 experiments. An extra of 30 mice will be used for pilot experiments. (testing diet on genetic diabetes models or training the procedure of pancreas-excision in obese mice)

Therefore a total of 150 mice is required for this part of the study.

Before starting the experiment a power calculation will be performed using this formula:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

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

To determine the effects of magnesium on the progression of diabetes, and to investigate the effects magnesium has on insulin secretion by the pancreas' islets we will use mice which are genetically modified to develop diabetes. For these experiments we will use a well-established model in the field of diabetes, such as db/db, ob/ob, Kir6.2-V49M mice. Before the start of the experiments, the exact genetic mouse model will be chosen based on the particular needs of this experiment. For all of these strains we have access to blood samples, that will allow us to determine basal magnesium concentrations which will be instrumental in the final choice of the genetic model.

Which model will be used is dependent on currently running *in vitro* analyses on samples of these mice as well as more in depth literature search.

If we want to make use of non-genetically modified mice, we will use mice of C57bl/6 background making our results easy to compare to previous results. To study the factors involved in the etiology of diabetes the mouse is well-established in this field of research.

To investigate the role of magnesium in genetic diabetes models and to determine the effects of magnesium on the pancreas of these mice we expect to use 40 mice per experiment (approximately 4 groups of 10 mice), in a total of 3 experiments. An extra of 30 mice will be used for pilot experiments. (testing diet on genetic diabetes models or training the procedure of pancreas-excision in obese mice). Therefore a total of 150 mice is required for this part of the study.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Commercial supplier	150	6-15 week old, adult mice

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like diabetes, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*. Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, can not be mimicked in a lower animal species.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. Pilot studies have been performed () that provide good data on variation and effect size of the proposed magnesium diets. If necessary because not all information is available, a pilot study will be performed. Based on these calculation the minimum number of animals will be used for our experiments.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport

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

Animals will only be handled by experienced and skilled researchers/technicians. Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired. When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels. When experiments will be performed with unknown side-effects, a pilot will be performed prior to the actual study.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Mice will be housed in groups, except when the collection of urine and faeces is desired. Then mice will be placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Possibly, mice will be given a non-standard diet. Namely a synthetic diet with either normal or low magnesium concentrations.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Blood collection can be painful, but because of the stress and risk of death by anesthesia we will not use anesthesia, as is custom for blood collection.

No anesthesia will be used for glucose/insulin tolerance tests as this influences glucose metabolism

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The main adverse effects on welfare of the genetic modification is the development of diabetes and involved side-effects hereof. The mice develop severe obesity (body weight can reach up to 60-70 gram). Therefore cage density will have to be taken into consideration. Moreover, diabetic mice tend to have increased urine production, which requires more frequent cage changes and extra absorbent bedding. *ob/ob* and *db/db* mice also have a reduced core body temperature, due to reduced thermogenesis, and cannot adapt well to reduced room temperature. Lastly, they may show weight loss and loss of condition as diabetes duration and hyperglycaemia increase.

A magnesium-deficient diet can induce muscle cramps and potentially increase the risk of heart attack. These side effects are being investigated in a pilot study, which is currently being performed ()

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include blood sampling, solitary housing (often in metabolic cage), fasting and glucose/insulin tolerance tests.

Explain why these effects may emerge.

- Obesity and Diabetes (and all of the side-effects hereof) due to genetic modification
- Possible muscle cramps/weakness and increased risk of heart attack due to magnesium-deficient diet
- Increased stress from solitary housing in metabolic cage
- Increased stress due to fasting & glucose/insulin tolerance tests

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

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are housed in solitary. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels.

The genetically modified mice will develop obesity and diabetes. They can have increased urine production, therefore cages will be cleaned more regularly, more bedding material will be available and water bottles will be filled more frequently to ensure ad libitum access.

As obese mice have reduced core body temperature due to reduced thermogenesis, more nesting/bedding material will be available. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like losing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when

an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.

3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment

4. (Reliable and applicable) results can not be achieved because of conditions not related with the experiment.

5. Specific humane endpoints for magnesium-deficient diets: visible muscle cramps, lack of movement, not able to hold on to the cage

6. Specific humane endpoints for effects of genetic modification: complete movement impairment, respiratory depression

7. The objective of the experiment has been reached.

The responsible researcher will contact the Animal Welfare Body (IvD) if criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the animal will not be taken out of the experiment.

If criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the responsible researcher is not available, an animal care taker or biotechnician or researcher has the obligation, (preferably after internal communication) to take the animal out of the experiment and euthanise it under general anaesthesia.

Indicate the likely incidence.

The incidence of endpoints by the magnesium-deficient diet is currently being investigated in a pilotexperiment ([REDACTED]). Currently, the pilot is running for 8 weeks, where no adverse effects are observed in mice given a severe magnesium-deficient diet (0.02% magnesium). Therefore we expect the incidence of humane endpoints by magnesium-deficient diet to be <5%

The incidence of humane endpoints by diabetes due to genetic modification is approximately <5%, according to literature

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Cumulative discomfort: moderate (due to the amount of mild procedures and obesity+hypomagnesemia).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The animals will be sacrificed to allow for the analysis of organs/tissues.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix**Description animal procedures**

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 4	Type of animal procedure Intervene in the intracellular cascade

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

To more thoroughly investigate the exact mechanism of the interplay of magnesium and DM2 we want to inject substances which intervene in the insulin signaling pathways. Administration of inhibitors of proteins involved in the intracellular pathway of the insulin receptor will be used to examine the effect this has on the insulin signaling, severity of diabetes and magnesium homeostasis. Moreover, substances involved in the intracellular pathway of magnesium transporters will be tested.

These substances can be given to wildtype mice with or without a special diet (high fat/low magnesium/low potassium) or genetically modified mice; this is completely dependent on the results obtained in part 1-3 of this study.

To quantify the severity of diabetes, several outcome parameters will be investigated.

The primary outcome parameter is fasting glucose as measure for the progression of the DM2. Since development of diabetes is the main outcome of our experiments, we will use several other additional parameters to determine this. An important being glycated HbA1c, as this parameter remains stable over a period of weeks (the lifetime of red blood cells). Other parameters include intraperitoneal insulin and oral glucose tolerance tests (widely used, standardized tests in diabetes animal studies that give information regarding insulin sensitivity/secretion), body weight, urine glucose (fasting), pro-inflammatory cytokines and the expression of GLUT2/GLUT4 in soft tissues.

To more thoroughly investigate the effect on magnesium homeostasis we will look at parameters such as serum and urine magnesium concentrations. This will show us the severity of hypomagnesemia in these mice.

We will also determine the expression of magnesium transporters in the intestines and kidney, as well as other transporters involved in renal ion homeostasis. There is great expertise in our department regarding this part.

In this part of the study we will also study more in depth the effects on several proteins involved in the intracellular pathways involved in magnesium/insulin/glucose handling.

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

To investigate the exact mechanism of the interplay of magnesium and Diabetes Mellitus type 2 (DM2) we will administer drugs that influence the intracellular insulin-receptor pathway, or pathways involved in magnesium homeostasis. The exact type of diabetes-model and type of drugs that will be used in these experiments is dependent on the results obtained in strategy 1 and 2.

Administration of drugs can be *via* the food, water, oral gavage or intraperitoneal injection. Optimal concentrations will be determined by literature research or, when this knowledge is insufficient, by a pilot study.

Before and during the animal experiments, the mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs per 2 weeks) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood will be collected by jugular vein puncture or tail vein puncture regularly (maximum 100µl / puncture and 1 puncture / 2 weeks). This will allow us to follow serum magnesium concentrations over time, as well as marker of diabetes and inflammation.

During the course of the experiment, mice will be subjected to intraperitoneal insulin tolerance test or oral glucose tolerance tests (maximum of 5 times in 16 weeks). These measurements contain an overnight fast (<12h) followed by intraperitoneal injection of insulin or a glucose bolus (2g/kg body weight) via orale gavage. Hereafter, in the subsequent two hours regular blood collection (at 15, 30, 60, 90, 120 minutes) will follow to measure serum glucose and insulin over time.

This procedure is standardized and widely used in the field of diabetes to investigate sensitivity to, and production of insulin. We also have a cooperation with a group who have great expertise with these techniques who will help us to correctly perform them.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

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

The number of mice is based on a project duration of 5 years. We expect to test at approximately 3 inhibitors in this part of the study. For each experiment we will use approximately 40 mice. Also pilot-experiments will be used to test effect and concentration of the drugs that will be used. This will require an additional 30 mice.

Therefore, we will need 150 mice for this part of the study.

Before starting the experiment a power calculation will be performed using this formula:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

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

We will make use of mice, often of C57bl/6 background as our previous data are generated using this strain, making our results easy to compare to previous results. To study the factors involved in the etiology of diabetes the mouse is well-established in this field of research as it is sensitive for the development of diabetes by a high-fat diet.

Depending on the results obtained in experiment #3 we will also investigate these inhibitors on genetic diabetes mouse models. (*ob/ob* and/or *db/db* or others).

We expect to test at approximately 3 inhibitors in this part of the study. For each experiment we will use approximately 40 mice. Also pilot-experiments will be used to test effect and concentration of the drugs that will be used. This will require an additional 30 mice. Therefore, 150 mice are required for this part of the study.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Commercial supplier	150	6-15 week old adult mice

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like diabetes, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*.

Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, can not be mimicked in a lower animal species.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. The studies that have been described in parts 1 and 2 of the project proposal will be used to obtain reliable data on variation and effect size allowing good power calculations. Based on these calculation the minimum number of animals will be used for our experiments.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport

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

Animals will only be handled by experienced and skilled researchers/technicians.

Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired.

When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels.

When experiments will be performed with unknown side-effects, a pilot will be performed prior to the actual study.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Mice will be housed in groups, except when the collection of urine and faeces is desired. Then mice will be placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Moreover, mice will be given a non-standard diet. Namely a synthetic diet with either normal or high fat content and normal or low magnesium concentrations.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

H. Pain and pain relief

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Blood collection can be painful, but because of the stress and risk of death by anesthesia we will not use anesthesia, as is custom for blood collection.

IP injection for insulin tolerance test, and possibly for administration of drugs is also not performed under anesthesia for the same aforementioned reason.

Moreover, no anesthesia will be used for glucose/insulin tolerance tests as this influences glucose metabolism

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice may suffer from adverse effects of the dietary intervention. The exact diet or combination of diets is dependent on the results obtained in part 1-3. Likely diets can include high-fat and magnesium-deficient.

A high-fat diet can cause an oily fur and increase scratching of the skin, which can potentially result in inflammation and dermatitis. By monitoring the mice daily, we will make sure to exclude those mice from the study in a timely manner.

A magnesium-deficient diet can induce muscle cramps and potentially increase the risk of heart attack. These side effects are being investigated in a pilot study, which is currently being performed.

Mice may develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional biting-material will be added to the cages

Mice may suffer from adverse effects from the inhibitors. In depth literature search and pilot experiments will have to determine the optimal dose, and potential side-effects that can arise. If drugs negatively regulate the intracellular downstream signaling pathway of the insulin receptor, possible side-effects could include development of (more severe) diabetes and ketoacidosis.

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include blood sampling, solitary housing (often in metabolic cage), fasting, glucose/insulin tolerance tests, intraperitoneal injection and oral gavage.

Explain why these effects may emerge.

- Side-effects from the administration of inhibitors involved in insulin and magnesium handling
- Obesity and Diabetes due to high-fat diet
- Possible muscle cramps/increased risk of heart attack due to magnesium-deficient diet
- Increased stress from solitary housing in metabolic cage
- Increased stress due to fasting & glucose/insulin tolerance tests
- Teeth problem due to the soft high-fat diet
- Stress/pain from oral gavage/intraperitoneal drug administration

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

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are housed in solitary. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Mice may develop teeth-problems when on high-fat diet (as this food is soft). Therefore additional gnawing-material will be added to the cages

Obese/diabetic mice can have increased urine production, therefore cages will be cleaned more regularly, more bedding material will be available and water bottles will be filled more frequently to ensure ad libitum access.

As obese mice have reduced core body temperature due to reduced thermogenesis, more nesting/bedding material will be available. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like loosing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.
3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment

Cumulative discomfort: moderate (due to the amount of mild procedures and 'double-diet': low magnesium + high fat)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The animals will be sacrificed to allow for the analysis of organs/tissues.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0073
2. Titel van het project: The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes.
3. Titel van de NTS: De rol van magnesium in diabetes type 2.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 23-04-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 12-05-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 18-05-2015 tot 22-06-2015 en van 13-07-2015 tot 15-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-06-2015 en 15-07-2015
 - advies aan CCD: 07-09-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 18-05-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - -3.2 Om het effect van magnesium-suppletie bij mensen met diabetes te kunnen onderzoeken is het niet noodzakelijk om vooraf dierexperimenten te doen. De onderzoekers worden verzocht dit preciezer te formuleren.
 - -4.1 De onderzoekers stellen dat er grote overeenkomsten zijn tussen muis en mens. Kunnen zij duidelijker uitleggen wat ze daarmee bedoelen?
 - **Project Proposal:**

- 3.1 Het projectvoorstel berust op een veronderstelde relatie tussen diabetes mellitus type 2 en hypomagnesiëmie. De onderzoekers schrijven dat mensen met diabetes vaak te weinig Mg²⁺ in hun bloed hebben. Kunnen zij aangeven hoe vaak? Wat is de incidentie, hoe groot is de groep met DM2 zonder hypomagnesiëmie? Uit een referentie uit 2003 blijkt dat Mg-suppletie een verbetering van het ziektebeeld teweeg kan brengen. Kunnen de onderzoekers uitleggen welk vervolgonderzoek er sindsdien is gedaan op basis van deze belangrijke resultaten, en welke conclusies daaruit zijn getrokken? Zijn er studies waar een dergelijk effect níét gevonden is? De commissie vindt het vreemd dat er de laatste 12 jaar kennelijk geen follow-up is geweest naar aanleiding van dergelijke veelbelovende resultaten. De onderzoekers stellen voorts dat het gebrek aan aandacht van klinici voor dit onderwerp wordt veroorzaakt doordat er geen kennis is over de onderliggende werkingsmechanismen. Gebrek aan kennis over het werkingsmechanisme is voor klinici doorgaans geen reden om een effectieve therapie niet toe te passen. In onderdeel 3.2 vermelden de onderzoekers dat er een long-lasting debate is over dit onderwerp. Een weergave van dit debate is op zijn plaats onder 3.1.

De onderzoekers willen ook de relatie van andere ionen met diabetes onderzoeken (onderdeel 3.3), maar dit wordt nergens beschreven in de gegeven achtergrond. De onderzoekers worden verzocht de interesse voor deze ionen hier toe te lichten en hun belang te onderbouwen.

- 3.2 De onderzoekers schrijven dat zij al eerder experimenten hebben gedaan met Mg-deficiënte of verrijkte diëten die een goede basis vormen voor toekomstige experimenten. De commissie mist de verwijzing naar deze experimenten in het onderdeel achtergrond.

- 3.4.1 onderdeel 3) De onderzoekers gebruiken genetisch gemodificeerde muizenmodellen voor diabetes. Wat is het magnesium-gehalte in het bloed van deze muizen? Vertonen zij hypomagnesiëmie? Waarom willen de onderzoekers de beta-cellen uit de pancreas van deze dieren in plaats van wildtype dieren in vitro onderzoeken?

- 3.4.1 onderdeel 4) Gaan de onderzoekers behalve het effect van medicijnen die ingrijpen op de intracellulaire pathways ook het effect van Mg-suppletie op het verloop van diabetes onderzoeken? In het algemeen vertonen de onderdelen 3.4.1 en 3.4.2 een grote mate van overlap. De commissie geeft de aanvragers in overweging 3.4.1 vooral te gebruiken voor het schetsen van het overall design (zonder te specifiek te worden).

- **Description of Animal Procedures:**

- DAP1-4, onderdeel B. De verantwoording voor de gevraagde aantallen dieren ontbreekt hier. De desbetreffende alinea uit onderdeel A, derde vraag kan hier toegevoegd worden ter verduidelijking.

Ook komen de aantallen in de tekst en in de tabel niet altijd overeen.

- DAP3, onderdeel A eerste vraag: Wat is de rationale voor het gebruik van het genetische model? Dit is onvoldoende onderbouwd. Leveren proeven met pancreasmateriaal van wt muizen geen bruikbare resultaten op?

- DAP3, onderdeel A tweede vraag: De onderzoekers zullen één genetisch muismodel kiezen uit ob/ob, db/db en anderen, waaronder het induceerbare model Kir6.2-V59M. Op grond waarvan wordt deze keuze gemaakt, en waarom is een genetische model noodzakelijk voor alle experimenten die in dit onderdeel zijn beschreven?

- Datum antwoord: 22-06-2015

- Strekking van de antwoorden:

- **Niet-technische samenvatting:**

-3.2-Zoals gevraagd door de commissie, hebben we het belang van onze studie verduidelijkt in de niet-technische samenvatting. We willen graag benadrukken dat we met dit project niet het effect van magnesium als interventie strategie bij diabetes patiënten willen onderzoeken en we zijn het ermee eens dat dit direct in patiënten zou kunnen. Het doel van dit project is om het moleculaire mechanisme te begrijpen. Hiervoor moeten we organen onderzoeken, RNA uit weefsels kunnen halen en een strikt gecontroleerde omgeving creëren, dit zou niet mogelijk zijn in proefpersonen. Door gebruik te maken van muizen kunnen we de effecten van de voorgestelde diëten op de nieren bekijken. Het onderzoeken van moleculaire signalering en het bekijken van het samenspel van organen en hormonen is niet mogelijk in mensen of celweek.

-4.1-In muizen kan op dezelfde wijze diabetes type 2 ontstaan als in de mens (namelijk door een te hoge energieopname en te weinig beweging). In muizen zorgen we voor de ontwikkeling van diabetes type 2 door het gebruik van hoog vet diëten. Hierdoor kunnen we het ontstaan van diabetes in de muizen goed vergelijken met het ontstaan van diabetes in de mens. Ook zijn de hormonale regulaties waar wij geïnteresseerd in zijn, vergelijkbaar tussen de muis en mens. Verder zijn in de nieren van muizen voor het grootste deel dezelfde transporters en dezelfde feedbackloops aanwezig.

- **Project Proposal:**

-3.1-Volgens de literatuur ligt de prevalentie tussen de 13.5 en 47.7%. Dit zijn gigantische hoeveelheden patiënten (aangezien er 400 miljoen diabetespatiënten wereldwijd zijn). In ons eigen cohort van 401 DM2 patiënten () vinden wij een hypomagnesiëmie (serum $Mg^{2+} < 0.7$ mmol/L) in 30% van de patiënten. De groep DM2 patiënten zonder hypomagnesiëmie in ons cohort is derhalve 70%.

Er zijn meerdere cohortstudies uitgevoerd die positieve effecten laten zien van orale magnesium op het ziekteverloop van diabetes. Twee meta-analyses laten beide positieve effecten zien op verschillende diabetes-markers; (Dong, J.Y., et al., Magnesium intake and risk of type 2 diabetes: meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Care*, 2011. 34(9): p. 2116-22.) (Song, Y., et al., Effects of oral magnesium supplementation on glycaemic control in Type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized double-blind controlled trials. *Diabet Med*, 2006. 23(10): p. 1050-6.) Echter, in de kliniek worden serum-magnesiumwaarden nog steeds niet standaard bepaald en is het gebruik van magnesium als interventie nog steeds niet in gebruik. De belangrijkste reden hiervoor is dat de bestaande studies allen op relatief kleine patiëntengroepen zijn uitgevoerd. Het opzetten van een grootschalige double blind randomized controlled trial is lastig doordat er weinig interesse is vanuit de farmaceutische industrie omdat magnesium vrij verkrijgbaar is. Niettemin zijn er sinds het artikel uit 2003 verschillende cohort-onderzoeken en meta-analyses uitgevoerd. Er worden echter nauwelijks studies uitgevoerd die ingaan op de moleculaire pathways. Twee belangrijke recentere studies die hier wel naar keken zijn: Song, Y., et al., Common genetic variants of the ion channel transient receptor potential membrane melastatin 6 and 7 (TRPM6 and TRPM7), magnesium intake, and risk of type 2 diabetes in women. *BMC Med Genet*, 2009. 10: p. 4. Nair, A.V., et al., Loss of insulin-induced activation of TRPM6 magnesium channels results in impaired glucose tolerance during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(28): p. 11324-9. ()

[REDACTED]. Wij willen in dit onderzoek verder ingaan op de moleculaire basis die ten grondslag ligt aan het ziektebeeld. Omdat de genoemde stelling voor verwarring kan zorgen, is dit weggehaald uit de background.

Mensen die lijden aan diabetes mellitus type 2 hebben naast hypomagnesiëmie ook andere ion verstoringen, namelijk in hun kalium, natrium, calcium en fosfaat niveaus.

Dit is zeer uitgebreid uitgezet in de review 'Liamis, G., et al., Diabetes mellitus and electrolyte disorders. World J Clin Cases, 2014. 2(10): p. 488-96'. Voornamelijk kalium is een ion waar we graag dieper op in zouden gaan in dit project omdat hypomagnesiëmie en hypokaliëmie vaak samen voorkomen in patiënten (omdat laag intracellulair magnesium het kalium-kanaal ROMK activeert wat resulteert in verhoogde renale kaliumexcretie).

Een laag kalium kan in diabetespatiënten voorkomen door exogeen insuline dat de opname van kalium in de spiercellen verhoogt, door malabsorptie in de darmen van diabetespatiënten en door een renaal verlies van kalium. Laag kalium is geassocieerd met een verlaagde insuline-excretie, hyperglycemie en perifeer glucose-opname. Om dit te verduidelijken hebben we bovenstaande informatie nu ook opgenomen bij punt 3.1 in ons projectvoorstel.

-3.2- In het verleden zijn verschillende experimenten uitgevoerd door [REDACTED]. Zij heeft meerdere malen zowel een magnesium-deficient als magnesium-verrijkt dieet gebruikt voor een maximum van 3 weken ([REDACTED]).

[REDACTED] Ook zijn wij zelf nu 13 weken bezig met een pilot waarin drie verschillende magnesiumdiëten worden getest om te kijken naar chronische effecten ([REDACTED]).

Om dit te verduidelijken hebben we bovenstaande informatie nu ook opgenomen bij punt 3.2 in ons projectvoorstel.

-3.4.1 onderdeel 3- Wij hebben geprobeerd bij verschillende onderzoeksgroepen om serum te ontvangen van db/db of ob/ob muizen. Echter wordt in bijna elk onderzoek gebruik gemaakt van EDTA buizen om bloed in op te vangen. Op het moment dat bloed is verzameld in EDTA-buizen, is het bepalen van magnesium niet meer mogelijk. We hebben slechts van 3 ob/ob muizen serum kunnen ontvangen, hierin zijn geen verschillen op serum magnesium waargenomen. Genetisch gemanipuleerde muizen als model voor diabetes zijn nuttig omdat deze in een veel kortere periode diabetes kunnen ontwikkelen vergeleken met het hoog-vet dieet model. Ook is het ongerief in deze muizen veel lager. Ze ontwikkelen geen vette huid met bijkomende huidinfecties en hebben ook geen problemen met hun tanden (aangezien er geen zacht hoog-vet voedsel nodig is). Door deze muizen een laag magnesiumdieet te geven, kunnen we bekijken wat voor effect dit heeft op de pancreas en insulineproductie/ insulinegevoeligheid. De eilandjes kunnen dan verder ex-vivo onderzocht worden.

-3.4.1- onderdeel 4 In een normale situatie hebben muizen al een (te) hoog serum magnesium. Dit komt omdat het normale voer dat ze krijgen viermaal zoveel magnesium bevat als dat nodig is. Het geven van 'extra' magnesium aan muizen in het voer verhoogt derhalve de serummagnesium spiegel niet verder. Dit is al naar voren gekomen in de experimenten van de hierboven genoemde [REDACTED].

We hebben de zinnen die meer op detail ingaan weggehaald.

- **Description of Animal Procedures:**

-DAP 1-4 onderdeel B: We hebben dit aangepast.

-DAP 3, onderdeel A eerste vraag- Zie antwoord op vraag bij 3.4.1 (Genetisch gemanipuleerde muizen als model voor diabetes zijn nuttig omdat deze in een veel kortere periode diabetes kunnen ontwikkelen vergeleken met het hoog-vet dieet model. Ook is het ongerief in deze muizen veel lager. Ze ontwikkelen geen vettige huid met bijkomende huidinfecties en hebben ook geen problemen met hun tanden (aangezien er geen zacht hoog-vet voedsel nodig is.) In dit onderdeel is het niet noodzakelijk om het effect van magnesium te bepalen op het ontstaan van diabetes zoals dat onderzocht wordt in deelonderwerp 1. In dit onderdeel wordt voornamelijk het effect van magnesium op de pancreas zelf bekeken. Effecten van magnesium op de pancreas van wildtype-muizen zal zeker ook onderzocht worden. Echter door de pancreas van diabetische muizen ex vivo te bestuderen worden ook de effecten van dit ziektebeeld op de pancreas meegenomen. Het weefsel van de pancreas van een diabeticus is in een zeer andere staat vergeleken met een 'normale' pancreas.

-DAP3, onderdeel A tweede vraag. De keuze wordt gemaakt op grond van literatuursearch en het analyseren van te verkrijgen samples van deze muizen (bepalen serum magnesium, expressie TRPM6 in nier). Waarom gebruik gemaakt wordt van een genetisch model is bij de bovengenoemde vraag beschreven. Het is echter niet zo dat in alle experimenten van dit onderdeel genetisch gemanipuleerde muizen worden gebruikt. Zoals hierboven ook is uitgelegd, zal namelijk ook gekeken worden naar effecten van magnesium op de pancreas van wildtype muizen (door dit ex vivo te bestuderen).

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 13-07-2015

- Strekking van de vragen:

- **Project Proposal:**

-3.1. Is de hypomagnesiëmie in de gewone niet-diabetische populatie hetzelfde als onder diabetici? Hoe aannemelijk is het dat de hypomagnesiëmie bijdraagt aan het ontstaan van de diabetes als 70% van de patiënten geen hypomagnesiëmie vertoont? En hoe relevant is binnen deze context de diabete muis zonder hypomagnesiëmie (3.4.1)? De onderzoekers worden verzocht deze informatie toe te voegen.

De gegeven antwoorden zijn niet allemaal verwerkt in de aanvraag. De commissie verzoekt de onderzoekers omwille van de leesbaarheid van het project voor de CCD de in de begeleidende brief gegeven informatie ook te verwerken in de projectaanvraag.

- Datum antwoord: 15-07-2015

- Strekking van de antwoorden:

- **Project Proposal:**

-3.1. De prevalentie van hypomagnesiëmie in de bevolking ligt tussen de 2,5% en 15%. De prevalentie van hypomagnesiëmie in diabetes mellitus type 2 (DM2) patiënten wordt geschat tussen de 13.5 en 47.7%. In ons cohort van diabetici ligt dit percentage op 30.5%. Dit is dus substantieel hoger dan de algemene bevolking. Het percentage hypomagnesiëmie in de normale bevolking is nu ook verwerkt in de achtergrond van de aanvraag.

-3.1. Er zijn meerdere publicaties die *in vitro* het effect van magnesium op insulineresistentie laten zien. Magnesium is een cofactor voor verschillende enzymen die betrokken zijn bij de activatie en intracellulaire signalering van de insuline receptor. In ratten op een laag

magnesiumdieet wordt een verminderde insuline expressie waargenomen. Ook is in ratten op een laag magnesiumdieet de fosforylatie van de insulinerceptor verminderd en hebben deze ratten een verhoogd glucose-niveau ten opzichte van ratten op een normaal dieet. Een ander belangrijk argument dat laat zien dat een hypomagnesiëmie kan bijdragen aan de ontwikkeling en progressie van DM2, is het feit dat magnesiumsupplementatie een positief effect heeft op de insulinesensitiviteit en glucosewaarden in diabetici. Ook verlaagt magnesiumsupplementatie de kans op het ontwikkelen van DM2 in hoog risicogroepen. Deze uitleg is eveneens verwerkt in de achtergrond van de projectaanvraag met de bijbehorende referenties.

-3.4.1 De diabete muis zonder hypomagnesiëmie wordt gebruikt als controle voor de diabete muis met hypomagnesiëmie. Zo kunnen we kijken of het hebben van een hypomagnesiëmie zorgt voor een snellere en/of ernstigere ontwikkeling van DM2 t.o.v. een normomagnesiëmie. De diabete muis zonder hypomagnesiëmie is derhalve een essentiële controle voor dit experiment.

De genoemde systematische review en andere artikelen genoemd in de vorige brief zijn nu ook verwerkt in de achtergrond.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to gain more insight in the mechanism of the development of hypomagnesiëmie in Diabetes Mellitus type 2 (DM2).' en 'to finally conclude whether low serum magnesium is a cause or consequence of DM2, or that both is the case.' De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken wat de invloed is van veel of weinig Magnesium, Kalium en Natrium of combinaties hiervan op het ontstaan en verloop van DM2 bij muizen, en welke moleculaire mechanismen betrokken zijn bij het verband tussen hypomagnesiëmie en DM2. Voorts zal duidelijk worden of een farmacotherapie gestoeld op deze kennis het ontstaan of het verloop van DM2 in muismodellen kan beïnvloeden. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapieën voor mensen met

DM2. Deze ziekte kent een hoge prevalentie in de bevolking. Hoewel de prevalentie van hypomagnesiëmie onder patiënten met DM2 significant hoger is dan die onder de normale gezonde populatie, zou de toch nog steeds relatief lage prevalentie van hypomagnesiëmie onder diabetici een reden kunnen zijn om af te zien van dit onderzoek. De commissie vindt echter dat er voldoende studies zijn die een positief effect van Mg-suppletie laten zien om dit onderzoek toch uit te voeren. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere therapieën voor DM2, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het effect van veel of weinig Magnesium en andere ionen op het ontstaan en het verloop van DM2 bij muizen, en geeft meer inzicht in de moleculaire mechanismen die hierbij betrokken zijn.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is voor het merendeel van de handelingen realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de gevolgen van de verschillende diëten die de muizen krijgen die leiden tot diabetes en ernstige obesitas (bij hoog vet dieet) of mogelijk leiden tot hartritmestoornissen en spierkrampen (bij laag Magnesium of laag Kalium dieet). De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde bloedafnames, het vasten, de glucose- en insulinetesten, de i.p. injecties in als licht. De commissie heeft zich gebogen over de inschaling van het ongerief veroorzaakt door de herhaalde solitaire huisvesting in metabole kooien gedurende 48 uur. In bijlage VIII van Richtlijn 2010/63/EU wordt kort verblijf in een metabole kooi (<24 uur) als voorbeeld van licht ongerief vermeld, wat impliceert dat een verblijf van 48 uur in een metabole kooi tot matig ongerief leidt. De onderzoekers schrijven in hun aanvraag dat een verblijf van 48 uur in een moderne metabole kooi licht ongerief voor de dieren veroorzaakt. Hoewel er tegenwoordig meer aandacht is voor het beperken van het ongerief voor dieren die in metabole kooien verblijven, is de commissie toch van oordeel dat een verblijf van 48 uur in een metabole kooi tot matig ongerief leidt. Op dit punt wijkt het oordeel van de commissie dus af van de inschaling van het ongerief in de aanvraag. Het ongerief als gevolg van de diëten schat de commissie in als matig, omdat de dieren hinder zullen ondervinden van de obesitas en diabetes (beide matige klinische abnormaliteiten zoals bedoeld in bijlage VIII van Richtlijn 2010/63/EU) die deze diëten veroorzaken. Op dit punt wijkt het oordeel van de commissie dus ook af van de inschaling van het ongerief in de aanvraag. De DEC is van mening dat de combinatie van al deze factoren tot maximaal matig ongerief leidt. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Een ziekte waarbij meerdere organen zijn betrokken kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze

aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 600 muizen.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Waar nodig wordt een pilot experiment gedaan om onbekende ernstige bijwerkingen zoveel mogelijk te voorkomen in het geplande experiment. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek kunnen belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven worden in het effect van de concentratie van magnesium en andere ionen op het ontstaan en het verloop van Diabetes type 2 (DM2) bij muizen, en in de moleculaire mechanismen die hierbij betrokken zijn. De resultaten zullen onder andere een indicatie geven of deze inzichten aanleiding zijn voor het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën, zoals magnesiumsuppletie. Het belang van meer inzicht in de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de interactie tussen DM2 en de magnesiumhuishouding en het beschikbaar komen van nieuwe interventies acht de DEC substantieel, gezien de toenemende prevalentie van DM2 in de bevolking. De resultaten uit dit onderzoek kunnen op korte termijn vertaald worden naar klinische toepassingen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de gebruikte diëten in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015239

Bijlagen

2

Datum 15 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015239. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

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: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC ST. Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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: 10 oktober 2015
Geplande einddatum: 10 oktober 2020
Titel project: The role of Magnesium in Type 2 Diabetes
Titel niet-technische samenvatting: De rol van magnesium in diabetes type 2
Naam DEC: RU Dec
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 10 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015239

Bijlagen

2

Datum 15 september 2015


Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 15 september 2015

Vervaldatum: 15 oktober 2015

Factuurnummer: 15700239

Ordernummer: 2015/0073 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015239	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 1 oktober 2015 8:59
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: aanvullende informatie op aanvraag AVD103002015239

Geachte [REDACTED]

De DEC heeft de onderzoekers niet gevraagd of zij van plan zijn beide geslachten of één geslacht te willen gebruiken. Ten tijde van de bespreking van dit project was nog niet duidelijk dat de CCD hier veel belang aan hecht. Ik heb de DEC nog niet gevraagd of zij graag een uitgebreide reactie wil geven op uw vraag. Dat zal ik zo meteen doen. Mocht die reactie inderdaad komen, dan zal ik deze naar u doorsturen.

Vriendelijke groeten,

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: maandag 28 september 2015 14:45
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie op aanvraag AVD103002015239

Geachte DEC leden,

Op 7 september 2015 heeft de RUDEC advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project 'The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes', uw kenmerk: 2015-0073.

In de bijlages beschrijving dierproeven is het gebruik van muizen beschreven. Er wordt niet vermeld of er sprake is van beide geslachten of een geslacht. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Daarom zou de CCD graag willen weten of dit besproken is in de DEC vergadering.

Indien u deze informatie niet bekend is, zullen we na u reactie met de aanvrager contact opnemen met dezelfde vraag.

In verband met doorlooptijd willen we u vragen om uiterlijk woensdag, 30 september 2015, op deze email te reageren.

Alvast hartelijk bedankt voor uw medewerking.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.
The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.
The Radboud university medical centre is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 2 oktober 2015 12:39
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: aanvullende informatie aanvraag AVD103002015239
Bijlagen: Aangaande vraag van de CCD op DEC 2015-0073.docx

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte CCD,

Hierbij het antwoord van de onderzoekers op uw vraag. Als er verder nog onduidelijkheden zijn horen wij het graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Radboud universitair medisch centrum
Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
Geert Grooteplein 10 [REDACTED]
www.radboudumc.nl

Aanwezig: ma, wo en vr van 8.30 – 17.00 uur

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: donderdag 1 oktober 2015 9:33
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD103002015239
Urgentie: Hoog

Geachte mevrouw [REDACTED]

Op 10 september 2015 hebben we uw aanvraag met aanvraagnummer AVD103002015239 voor het project 'The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes' ontvangen. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.


In de bijlages beschrijving dierproeven is het gebruik van muizen beschreven. Er wordt niet vermeld of er sprake is van beide geslachten of een geslacht. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is alleen dieren van een geslacht te gebruiken?

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

U kunt de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op sturen, maar om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk vrijdag, 2 oktober 2015, uw antwoord aan ons te sturen.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,


Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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


T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



Geachte 

In reactie op uw mail van 1 Oktober 2015, aangaande het project met aanvraagnummer 'AVD103002015239', hebben wij hierbij toegevoegd het antwoord op de vraag in de desbetreffende mail.

We hopen dat we de vraag naar wens hebben beantwoord en dat de reden voor het gebruik van enkel mannelijke dieren in dit onderzoek verduidelijkt is.

Met vriendelijke groet,

A black redaction box covering the signature area at the bottom left of the page.

In het project getiteld 'De rol van magnesium in diabetes type 2' zal gebruik worden gemaakt van muizen om te bepalen of hypomagnesemie in diabetes mellitus type 2 een oorzaak of gevolg is van dit ziektebeeld. Om dit te onderzoeken zal in dit project slechts gebruik worden gemaakt van mannelijke muizen. Dit wordt gedaan om effecten van vrouwelijke hormonen uit te sluiten. Het is namelijk al sinds 1984 bekend dat oestrogeen-niveaus en magnesium homeostase aan elkaar gekoppeld zijn [1]. In vervolgstudies hebben ze eenzelfde correlatie laten zien tussen oestrogeen en magnesiumspiegels [2, 3]. Naar aanleiding van dergelijke publicaties is onze groep gaan uitzoeken wat het moleculaire mechanisme is dat ten grondslag ligt aan dit fenomeen. [REDACTED] dat oestrogeen een direct effect heeft op de magnesiumtransporteur 'TRPM6' in de nier [4]. Dit directe effect van oestrogeen op TRPM6 zorgt er dus voor dat oestrogeen de magnesiumhomeostase beïnvloedt. Om deze reden kunnen vrouwelijke dieren niet gebruikt worden in onze onderzoeken aangaande magnesiumhomeostase in diabetes mellitus type 2.

1. McNair, P., C. Christiansen, and I. Transbol, *Effect of menopause and estrogen substitutional therapy on magnesium metabolism*. Miner Electrolyte Metab, 1984. **10**(2): p. 84-7.
2. Seelig, M.S., *Interrelationship of magnesium and estrogen in cardiovascular and bone disorders, eclampsia, migraine and premenstrual syndrome*. J Am Coll Nutr, 1993. **12**(4): p. 442-58.
3. Muneyyirci-Delale, O., et al., *Serum ionized magnesium and calcium in women after menopause: inverse relation of estrogen with ionized magnesium*. Fertil Steril, 1999. **71**(5): p. 869-72.
4. Cao, G., et al., *Regulation of the epithelial Mg²⁺ channel TRPM6 by estrogen and the associated repressor protein of estrogen receptor activity (REA)*. J Biol Chem, 2009. **284**(22): p. 14788-95.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015239

14 OKT. 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 10 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of Magnesium in Type 2 Diabetes" met aanvraagnummer AVD103002015239. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "The role of Magnesium in Type 2 Diabetes" starten. De vergunning wordt afgegeven van 13 oktober 2015 tot en met 10 oktober 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU Dec gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Het advies wordt gevolgd en in aanvulling daarop zijn enkele algemene voorwaarden opgenomen. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.



Bezwaar

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

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

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

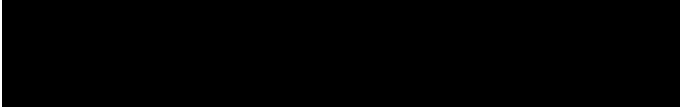
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

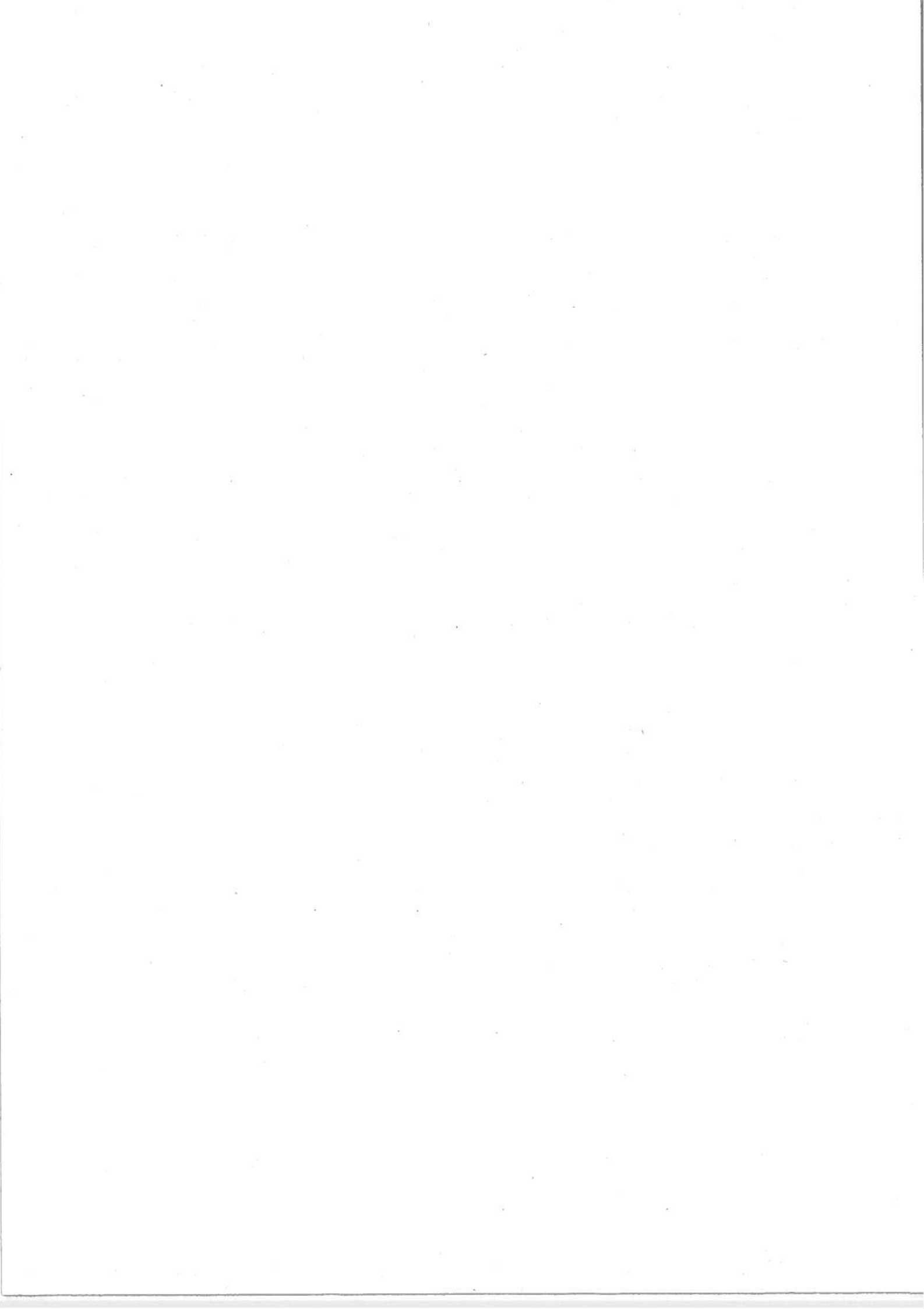
Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

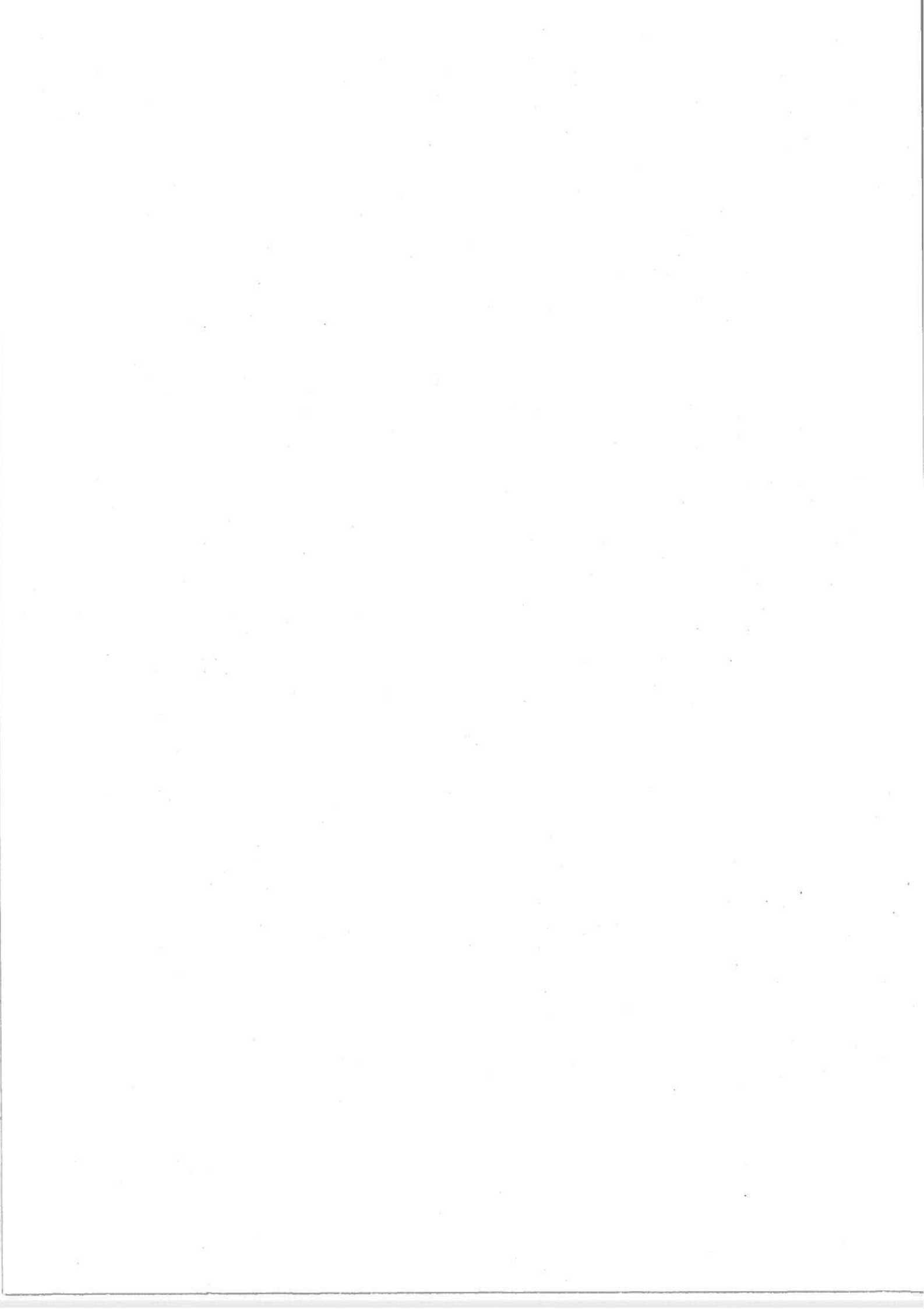
Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 oktober 2015 tot en met 10 oktober 2020, voor het project "The role of Magnesium in Type 2 Diabetes" met aanvraagnummer AVD103002015239, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU Dec.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 september 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 september 2015, ontvangen op 10 september 2015.



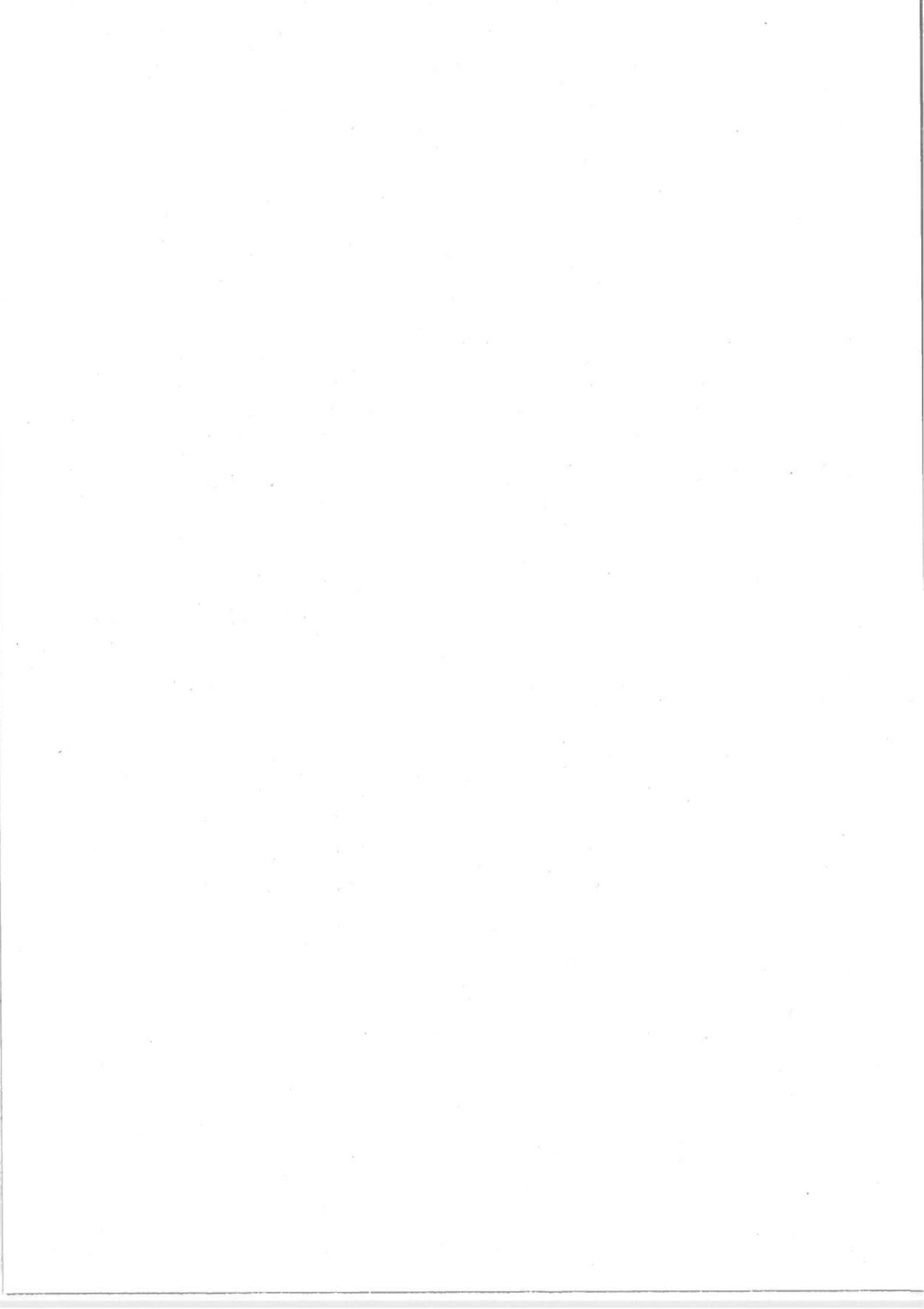
Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Magnesium deficiency in fat-induced DM2	Muizen (Mus musculus) / C57bl/6	100	Matig / moderate	
Mouse models using different dietary ion contents	Muizen (Mus musculus) / C57bl/6	200	Matig / moderate	
Magnesium deficiency in genetic DM2 models	Muizen (Mus musculus) / db/db, ob/ob, Kir6.2-V49M; C57bl/6	150	Matig / moderate	
Intervene in the intracellular cascade	Muizen (Mus musculus) / C57bl/6; ob/ob and/or db/db	150	Matig / moderate	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.



Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

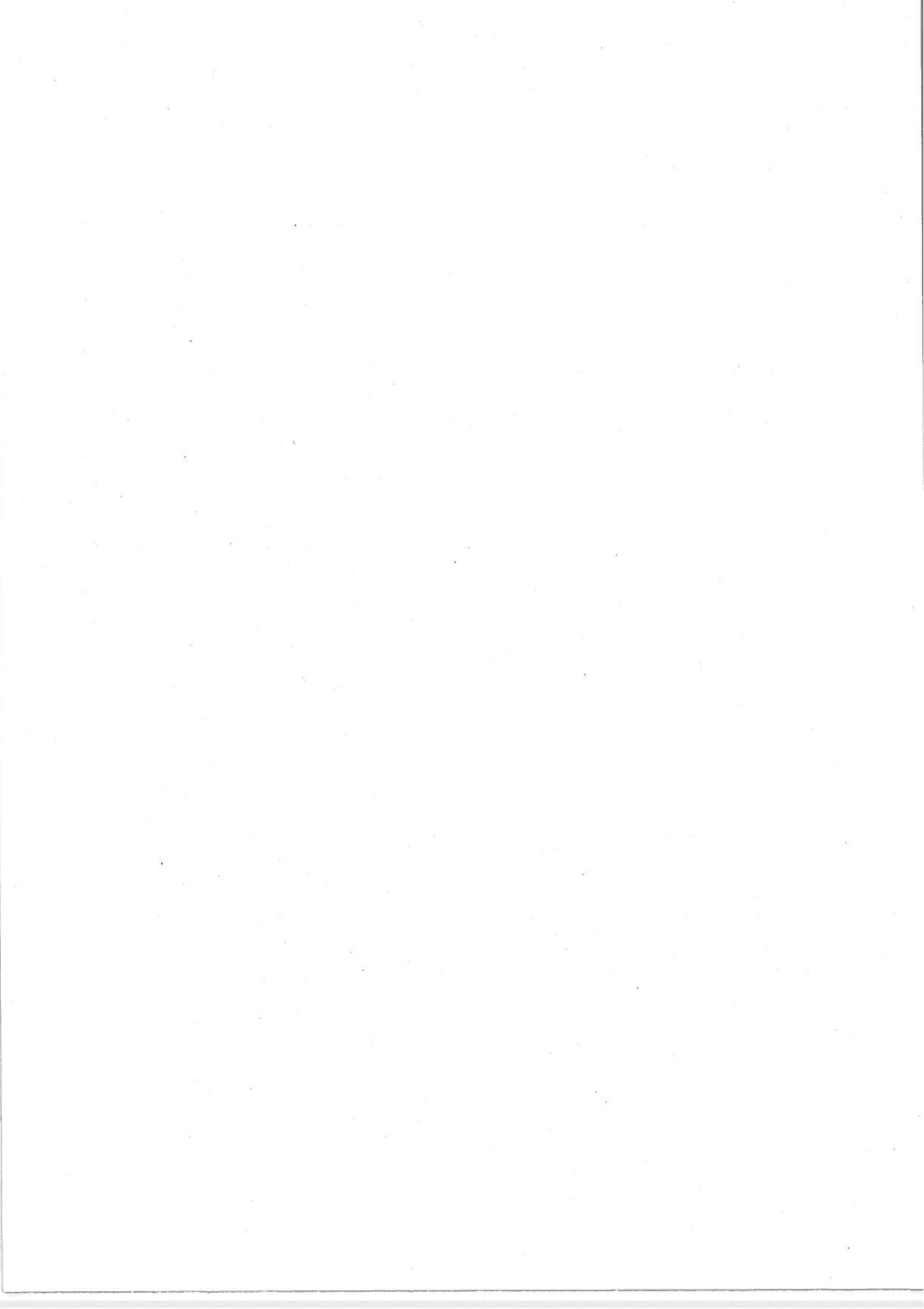
De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting,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

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

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

Pijnbestrijding en verdooving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier



niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 14 oktober 2015 12:14
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling besluit op aanvraag AVD103002015239

Geachte DEC leden,

Enige tijd geleden hebben wij een advies van u ontvangen betreffende aanvraag AVD103002015239, 'The Role of Magnesium in Type 2 Diabetes'.

Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug. De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IVD.

De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

We hopen u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015240								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x			x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Factuurinformatie				x		x	x	
10	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
11	Telefoonnotitie				x		x	x	x
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	

15 SEP. 2015



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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

<p>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></p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen</p>
<p>1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.</p>	<p>Naam instelling of organisatie Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted] KvK-nummer 4 1 0 5 5 6 2 9</p>
<p>1.3 Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i></p>	<p>Straat en huisnummer Geert Grooteplein 10 Postbus 9101 Postcode en plaats 6500HB Nijmegen IBAN NL90ABNA0231209983 Tenaamstelling van het rekeningnummer UMC St Radboud</p>
<p>1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<p>(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie [Redacted] Afdeling [Redacted] Telefoonnummer [Redacted] E-mailadres [Redacted]</p>
<p>1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<p>(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie Postdoc Afdeling [Redacted] Telefoonnummer [Redacted] E-mailadres [Redacted]</p>

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 0 _ 1 0 _ 2 0 1 5
- Einddatum 1 0 _ 1 0 _ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The FGF23-klotho-vitamin D axis as a new instrumental target to combat the cardiovascular
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De FGF23-klotho-vitamine D als als een nieuwe instrumentale doelstelling om het cardiovas
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

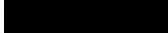
6 Ondertekening

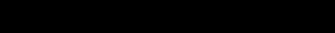
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

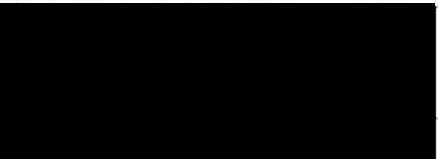
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 10 - 09 - 2015

Handtekening 



**Form
Project proposal**

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3 Provide the title of the project.	The FGF23-klotho-vitamin D axis as a new instrumental target to combat the cardiovascular risk of chronic kidney disease

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research <input type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures <input type="checkbox"/> Higher education or training
---	--

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

This project is part of [REDACTED] granted by [REDACTED]) CP 10.11).

Chronic kidney disease (CKD) has a high prevalence currently affecting millions of people, and is a major public health issue. Accumulating data suggest that in patients with CKD, in addition to well-known risk factors like oxidative stress, renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) activation and proteinuria, a disrupted FGF23-klotho-vitamin D axis contributes to progressive renal failure and a severely increased cardiovascular risk (1). CKD, with its consequent imbalance between renal function and dietary calcium and phosphate load, triggers a vicious circle of the FGF23-klotho-vitamin D axis (2). When phosphate is in excess, FGF23 is secreted from bone and acts on the kidney to promote phosphate excretion into urine and to suppress vitamin D synthesis, thereby inducing a negative phosphate balance. One critical feature of FGF23 is that it requires klotho, a single-pass transmembrane protein expressed in renal tubules, as an obligate co-receptor to bind and activate FGF receptors. Increased plasma FGF23 levels and loss of renal klotho are early hallmarks of CKD (3). While ensuring renal phosphate excretion despite renal function impairment, the rise in FGF23 contributes to vitamin D deficiency (4). The latter blunts renin suppression, which by increased angiotensin II further impairs renal klotho generation.

In addition, it has been demonstrated that klotho protects against oxidative stress induced damage and that klotho deficiency leads to increased oxidative stress. Renal klotho deficiency impairs FGF23 signaling in the kidney, thus contributing to a further increase in FGF23, and may, moreover, lead to a systemic klotho deficiency (4). Increased FGF23 levels and klotho deficiency adversely affect vascular function and structure by effects on vitamin D metabolism, direct vascular toxicity/calcification, or both (5-7). Vascular calcification in CKD patients is strongly linked to deregulated mineral metabolism, mainly reflected in increased serum phosphate levels and transient states of hypercalcemia. Recently, high serum magnesium (Mg²⁺) was associated with a reduced risk for cardiovascular events (8). The beneficial effects of Mg²⁺ have not been examined in detail, but it has been suggested that these effects can be attributed to reduced vascular calcifications. Using magnesium as a novel treatment strategy, we aim to improve outcome in CKD patients suffering from vascular calcification. Therefore, by uncovering the molecular mechanism of Mg²⁺ and how it results in vascular calcification, we aim to increase awareness among clinicians to routinely measure magnesium in CKD, and if needed, give magnesium supplementation to CKD patients. For the experiments proposed here, the *in vitro* part has been performed and the data are very

promising. In short: high phosphate is the hallmark of CKD and to mimic the calcification in CKD patients, human smooth muscle cells were incubated and cultured in high phosphate levels (3mmol) in the absence or presence of magnesiumchloride (final concentration 2mmol). After 14 days, clear calcium phosphate deposits were observed under high phosphate conditions, that were completely absent in the cells co-cultured with high concentrations of Mg²⁺.

Targeting FGF23 and/or klotho may provide a novel treatment paradigm with the potential to improve outcome in CKD. Therefore, our overall hypothesis is that derangement of the FGF23-klotho-vitamin D axis, in cross talk with the renin- angiotensin-aldosterone-system, is involved in the cardiovascular complications of CKD from its earliest stages onwards.

FGF23 seems to function as a protective factor, as it triggers adaptive changes that maintain a normal body phosphate homeostasis. Thus, modulation of the FGF23-klotho-vitamin D axis could represent a promising therapeutic target that might improve the fatal prognosis of patients with CKD and cardiovascular diseases. Assuming that the study goals are met and it is demonstrated that elevated FGF23 levels and/or klotho deficiency are important in the treatment of CKD patients, they can become novel targets in the treatment of CKD patients.

References:

- (1) Rika Jimbo, Tatsuo Shimosawa. Cardiovascular Risk Factors and Chronic Kidney Disease—FGF23: A Key Molecule in the Cardiovascular Disease. *Int J Hypertens.* 2014; 381082.
- (2) John GB1, Cheng CY, Kuro-o. Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis.* 2011 ;58(1):127-34.
- (3) Sakan H, Nakatani K, Asai O, Imura A, Tanaka T, Yoshimoto S, Iwamoto N, et al.,. Reduced renal alpha-Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism. *PloS one* 9: e86301, 2014.
- (4) Yoon HE, Ghee JY, Piao S, Song JH, Han DH, Kim S, Ohashi N, Kobori H, et al., Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho, the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 800-13.
- (5) Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, et al., Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117: 503-11.
- (6) Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, et al., Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med.* 2008; 168: 1340-9.
- (7) Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, et al.,. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2008; 359: 584-92.
- (8) Kanbay M, Yilmaz MI, Apetrii M, Saglam M, Yaman H, Unal HU, Gok M, et al., Relationship between serum magnesium levels and cardiovascular events in chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol.* 2012;36:228-237.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The aim of this project is to gain more insight in the underlying mechanism involved in the development of CKD and its extra renal consequences in the vascular bed. Our research group has a great expertise in the field of renal disease and ion handling. In the past we have used CKD mouse

models (either genetically induced or via surgery) and performed dietary interventions. Therefore, we have already generated a strong foundation for future experiments.

In CKD, intrarenal derangements in the FGF23-klotho-vitamin D axis occur in a vicious circle with increased RAAS activity and pathways of oxidative stress. The extrarenal consequences of these derangements are involved in the vascular complications of CKD.

Therefore we hope to meet these sub-aims:

- To delineate the role of RAAS blockade on the FGF23-klotho-vitamin D axis.
- To delineate effect of oxidative stress modulation on the FGF23-klotho-vitamin D axis.
- To unravel the role of deregulation of the FGF23-klotho-vitamin D axis in the increased cardiovascular risk of progressive CKD.
- To unravel the underlying mechanisms involved in vascular calcification alleviation by magnesium.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

Low levels of klotho hormone and elevated levels of FGF23 hormone may serve as an early warning sign of the presence of kidney disease and its deadly cardiovascular complications. Abnormalities of klotho and FGF23 levels may be involved in the development of these severe complications. To be able to adequately react to these threats, by prevention or treatment, it is of the utmost importance that we will get new insights into the mechanisms leading to CKD and derangements in these substances. Initial data suggests a potential role of klotho that may be beneficial in the prevention of CKD. Together with FGF23, klotho enhances renal phosphate excretion in order to maintain serum phosphate levels within the normal range. In addition, vitamin D is also an important hormone, produced by the kidney, to regulate phosphate balance. Hyperphosphatemia and hypercalcemia induce vascular calcification and atherosclerosis of the main arteries, including the aorta, which in turn cause increased stiffness of the vessel wall. Combined results of clinical, *in vitro* and *in vivo* studies show the beneficial effects of Mg²⁺ on the pathogenesis of vascular calcification. It will be our hope that this and future research will ultimately lead to better ways to slow down the progression of CKD.

Medical & Societal relevance

Chronic kidney disease (CKD) is currently a major medical problem worldwide, of which the incidence is still increasing which is accompanied by a high degree of morbidity and mortality. In line with that, cardiovascular complications originated from CKD are greatly increasing. It would be worthwhile, therefore, to explore a strategy and to test potential therapeutic options to treat these disturbed electrolyte homeostasis originated by CKD. In addition, administration of magnesium to treat vascular calcification could strongly reduce treatment costs and improve patient health in a simple and non-invasive manner. Therapeutic possibilities to treat the progression of CKD, would be a huge step forward in order to inhibit the progression and the development of CKD. Finding alternative treatments that will relatively alleviate these burdens and provide a better living condition.

3.4 Research Strategy

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

We will use a variety of approaches:

In the first 3 subprojects, the impact of pharmacological interventions (RAAS-blockade, antioxidants) on the FGF23-klotho-vitamin D axis will be studied using various mouse models.

- Specific preservation of renal klotho in CKD: role of RAAS, genetically altered model

- Specific preservation of renal klotho in CKD: role of oxidative stress

Some genetically altered animal models in our research question (i.e, FGF23 KO mice) are not a CKD model and therefore they need an extra approach to induce CKD. Among the available experimental models for CKD, the 5/6 nephrectomy has been a mainstay for studies of kidney disease and is performed by unilateral nephrectomy and removing of the poles of the remaining kidney after one week from the first surgery [1,2]. 5/6 nephrectomy shows common features to CKD observed in humans [3]. It has been used to test new therapies [4,5] and has been proven to be clinically relevant [6]. A less invasive model like adenine treatment is also available which does not require surgery. The major disadvantage is that the adenine model produces a more severe form of bone disease than 5/6 nephrectomy does [7]. Here, we are looking at the effect of the FGF23, Klotho and vitamin D axis, which are bone and kidney originated genes/hormones. Therefore, the adenine diet is not useful for our study. In addition, we performed a pilot study (██████████), to check whether chronic injection of Doxorubicin can lead to CKD in C57bl/6 mice. We selected C57bl/6 mice since most of our KO mice are generated in this mice strain. We found that this model is not severely inducing CKD and this model is not optimal to study CKD. Therefore using a surgical approach like 5/6 nephrectomy will be used to induce sufficient amount of CKD in a genetically altered mouse model which are interesting to our research question.

- Specific preservation of renal klotho in CKD: role of RAAS, surgically induced model

- Specific preservation of renal klotho in CKD: role of oxidative stress, surgically induced model

In the last subproject, the impact of Mg²⁺ interventions on the CKD induced vascular calcification will be studied using various CKD mouse models:

- Genetically modified CKD mouse models (i.e, klotho knock-out mice) + high magnesium diet

References:

1. Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Johnson RJ. Nitric oxide modulates vascular disease in the remnant kidney model. *Am J Pathol.* 2002;161:239–248.
2. Santos LS, Chin EW, Ioshii SO, Tambara Filho R. Surgical reduction of the renal mass in rats: morphologic and functional analysis on the remnant kidney. *Acta Cir Bras.* 2006;21:252–257.
3. Kren S, Hostetter TH. The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int.* 1999;56:333–337.
4. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R. Losartan-hydrochlorothiazide association promotes lasting blood pressure normalization and completely arrests long-term renal injury in the 5/6 ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292:F1810–1818.
5. Terzi F, Burtin M, Hekmati M, Jouanneau C, Beaufils H, Friedlander G. Sodium restriction decreases AP-1 activation after nephron reduction in the rat: role in the progression of renal lesions. *Exp Nephrol.* 2000;8:104–114.
6. Waanders F, Vaidya VS, van Goor H, Leuvenink H, Damman K, Hamming I, Bonventre JV, Vogt L, Navis G. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system inhibition, dietary sodium restriction, and/or diuretics on urinary kidney injury molecule 1 excretion in nondiabetic proteinuric kidney disease: a post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis.* 2009;53:16–25.
7. Ferrari, Guaraciaba O; Ferreira, Juliana C; Cavallari, Raquel T; Neves, Katia R; dos Reis, Luciene M et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. (2014) *BMC nephrology* vol. 15 (1) p. 69

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

To elucidate the mechanism of CKD development and the role of FGF23, klotho and vitamin D, we will use four different approaches.

RAAS blockade, role of FGF23, klotho and vitamin D in CKD

A diet/water intervention with RAAS blockade combined with a genetic mouse model of CKD.

The interplay between the molecular pathways involved in RAAS and the FGF23-klotho-vitamin D axis will be studied. To this end, FGF23 and 1 α -hydroxylase knockout mice will undergo a diet/water intervention with RAAS- blockades. Using this approach we will be able to determine the importance of FGF23, klotho and vitamin D and its interaction with the RAAS system in CKD. In addition we will elucidate the underlying mechanism involved in the CKD progression by using special KO mice and the role of FGF23, klotho and vitamin D in this prospective.

Oxidative stress modulation, role of FGF23, klotho and vitamin D in CKD

A dietary intervention with antioxidant combined with a genetic mouse model of CKD.

The interplay between the molecular pathways involved in oxidative stress and the FGF23-klotho-vitamin D axis will be studied. To this end, FGF23 KO, klotho KO and 1 α -hydroxylase KO mice or other strains will be given a diet with an antioxidant (i.e, vitamin E) incorporated. With this, we want to dissect the role of oxidative stress pathways and their importance in FGF23, klotho and vitamin D modulation in CKD. In addition, we will elucidate the underlying mechanism involved in CKD progression, and the role of FGF23, klotho and vitamin D in this prospect, by using special KO mice.

RAAS blockade, role of FGF23, klotho and vitamin D in CKD

A genetically altered mouse model with surgically induced CKD with a diet/water intervention with RAAS blockade.

The interplay between the molecular pathways involved in RAAS and the FGF23-klotho-vitamin D axis will be studied. To this end, WT and KO mice will undergo a 5/6x nephrectomy to mimic CKD and to study the effect of RAAS modulation in the FGF23-klotho-vitamin D axis. Using this approach we will be able to determine the importance of FGF23, klotho and vitamin D and its interaction with the RAAS system in CKD. The 5/6 nephrectomy is known as the golden standard model for CKD. Therefore, CKD progression and the role of FGF23, klotho and vitamin D will be studied in this prospect.

High Mg²⁺ diet to reduce vascular calcification

A dietary intervention with high magnesium combined with a genetic mouse model of CKD.

To check the effect on vascular calcification in the presence of high magnesium in CKD mouse models (i.e, klotho KO) and in control (WT) mice. Using this approach we will be able to understand the role of magnesium homeostasis in calcified vascular smooth muscle cells, in the situation where FGF23, vitamin D and/or klotho are altered. Specific attention will be awarded to calcium and the calcium sensing receptor, since it is shown that activation of calcium sensing receptor reduces vascular calcification.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

Part 1) Using RAAS blockades/inhibitors, incorporated in the diet (either food or water), we expect to improve the CKD phenotype and normalize mineral (ion) levels in the serum of genetically modified CKD mice. An example of this approach is using an angiotensin II blocker in klotho or 1 α -hydroxylase (mice with vitamin D deficiency) knock-out (KO) mice.

Part 2) Using antioxidants (e.g. vitamin E), incorporated in the diet (either food or water), we expect to normalize the mineral (ion) homeostasis and to improve the CKD phenotype in genetically modified CKD mice (e.g. Klotho or 1 α -hydroxylase KO mice). We expect to see a reduction in oxidative

stress pathways and rather a normal level of FGF23, vitamin D or klotho in CKD mice. If no effects are observed on ion-levels, especially phosphate levels, or in the expression of ion-transporters in the kidney, this part of the study will be only limited to a maximum of 3 antioxidants.

Part 3) Genetically modified mice might not totally represent the CKD as is seen in humans. Therefore, we want to use the 5/6 nephrectomy, to induce CKD properly in the mice. By administering RAAS inhibitors, we expect to see a normalization of renin, angiotensin and aldosterone levels, and rather normal levels of FGF23, klotho and vitamin D. The 5/6 nephrectomy model shows a progressive CKD phenotype over time and is a golden standard to study CKD. However, if no effects are observed in part 1, on mineral levels (especially phosphate levels) or on the expression of ion-transporters in the kidney, this part (part 3) of the project will not be performed (go/no-go point).

Part 4) CKD mice develop hyperphosphatemia and hypercalcemia. Mg²⁺ is shown to be effective in the attenuation of vascular calcification. Using a dietary intervention (high Mg²⁺ diet) in genetically modified CKD mice (e.g. Klotho KO or 1 α -hydroxylase KO), this attenuation will be assessed. Mg²⁺ treatment is expected to reduce vascular calcification, especially at the level of vascular smooth muscle cells, in the absence of klotho or vitamin D. Based on our in vitro data (explained further on), we are expecting to see a reduction in phosphate and Ca²⁺ levels, at least in the klotho KO mice. If this expected result does not appear, we will not use other KO strains for CKD and we will not continue (go/no-go).

It is of the utmost importance that we will get new insights into the underlying mechanisms leading to CKD. Therefore, the deregulation of the FGF23-klotho-vitamin D axis is being investigated by RAAS and oxidative stress modulation.

The extra renal consequences of CKD will be investigated by testing Mg²⁺ intervention. We will study its possible beneficial effect in the vascular bed due to a deregulated FGF23-klotho-vitamin D axis. We will check if this non-invasive and cost-effective treatment is suitable in the improvement of vascular calcification.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	RAAS blockades, genetic model, and FGF23, Klotho and vitamin D in CKD
2	Oxidative stress and FGF23, Klotho and vitamin D in CKD
3	RAAS blockades, surgical model, and FGF23, Klotho and vitamin D in CKD
4	CKD induced calcification treatment with Mg ²⁺

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure RAAS blockades, genetic model, and FGF23, Klotho and vitamin D in CKD

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The aim of this project is to characterize the role of RAAS on the FGF23-klotho-vitamin D axis. We will use adult genetically modified mice and a pharmacological approach. RAAS has a key role in the regulation of blood pressure, sodium and water balance, and cardiovascular and renal homeostasis. RAAS blockade using angiotensin-converting-enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin-receptor blockers (ARB) is the cornerstone in the treatment of renal disease. Alternative RAAS-blockade strategies include renin inhibition and aldosterone blockade. The effect of different RAAS blockades in the FGF23-klotho-vitamin D axis is not known. The FGF23-klotho-vitamin D axis can be regulated differently using different targets for blockades like renin, angiotensin-converting-enzyme, angiotensin-receptor or aldosterone. It is therefore important to investigate the effect of different blockades in the FGF23-klotho-vitamin D axis. [Here we will use a maximum of 4 different RAAS blockades, in which they are blocking one of the above-mentioned parts of RAAS.](#)

The groups will consist of CKD mouse models of (e.g. klotho KO mice, 1 α -hydroxylase KO mice, or other available mice strains in the coming 5 years) and will be given ACE inhibitors or ARB blockers, in either drinking water or incorporated with diet.

- CKD genetically modified mouse model + RAAS blockades incorporated in food/water
- CKD genetically modified mouse model + normal food/water
- Wildtype littermate mice + RAAS blockades in incorporated in food/water
- Wildtype littermate mice + normal food/water

Animals coming from the same family will be randomly distributed across the groups, we will then check the body weight because we want to be sure that we don't have one group with all the smallest/biggest animals. For this reason based on their body weight we correct the distribution of the animals when it is necessary. We don't expect to find any big differences since they have similar age.

To quantify the improved phenotype of the CKD mice after using RAAS blockades, several outcome parameters will be investigated.

The primary outcome parameters are serum and urine urea, creatinine, calcium and phosphate concentrations. In addition, we will check the levels of FGF23, klotho and vitamin D in serum, urine and the kidneys of the mice. RAAS blockades are the first-line therapy for renoprotection in patients with CKD, as recommended by current guidelines. However, despite the proven benefits of this treatment strategy, the interactions between the FGF23-klotho-vitamin D axis and RAAS blockades in CKD are yet to be investigated. To more thoroughly investigate the effect on kidney function we will also check Glomerular Filtration Rate (GFR).

We will also study more in depth the effects on several proteins involved in the intracellular pathways involved in FGF23, klotho and vitamin D handling.

We will also determine the expression of Ca²⁺ and phosphate transporters in the intestines and kidney, as well as other transporters involved in renal ion homeostasis. There is great expertise in our department regarding CKD and ion handling.

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

We will use a genetic mouse model of CKD (i.e, klotho KO, 1 alpha-hydroxylase KO and others) and we will use RAAS blockades (ARB or ACE inhibitor) for example Losartan, incorporated with diet or with drinking water.

To study the effects of RAAS on the FGF23-klotho-vitamin D axis in CKD, we will use RAAS blockades (ARB or ACE inhibitor).

Before and during the animal experiments, mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs at the start, middle and end of the experiment) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood will be collected at different time intervals (start, middle and end of experiment). This will allow us to follow serum phosphate concentrations over time to see how RAAS blockade is effecting to inhibit CKD.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

From the collected serum and urine we can measure the creatinine levels and there is a formula to measure GFR with that this will give us an indication how well a kidney is working.

The duration that animals will be in the experiment is different depending on the strain of mice (3 to 8 weeks). For instance, klotho KO mice have short life span and therefore they will be shorter (3 to 4 weeks) in the experiment in comparison to the other strains of mice.

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

Subsequently in each individual experiment, independent statistics will be carried out by using power calculation as below, to reduce the amount of mice used to a minimum:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

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

Adult: max. 480

We will make use of adult mice (*mus musculus*). We will use KO mouse models of CKD, often of a C57bl/6 background as our previous data are generated using this strain, making our results easy to compare to previous results.

To study CKD, the mouse is a well-established model in this field of research and a lot of literature is available. Mice are a highly relevant model because it will support (or contradict) the currently widely adopted hypothesis that FGF23 is a novel target in chronic kidney disease. In addition, given the fact that our research questions are largely mechanistically and involves the study of renal tissue, the use of animals in this type of study is unavoidable. We will therefore make use of mice because 1) the mouse is well-established in this field of research and 2) the mouse offers superior genetic models to study the molecular genetic background of complex diseases. Furthermore, mice resemble the situation in humans with CKD much better than cultured cells. Therefore, *in vivo* studies in animals cannot be avoided. By choosing male mice, the potential distribution due to hormonal influences, is kept as low as possible. It is currently not known whether changing levels of sex hormones may exert an influence on the regulation of calcium / phosphorus balance.

The number of mice per experiment will be based on statistical analysis (power analysis), our experience with similar type of experiments and/or (un)published data as below:

Quantitative analysis: prior to performing an experiment we perform statistical analysis to ensure that we use the minimum number of mice per group that will be statistically sound and biologically relevant.

Qualitative analysis (most of our experiments): the number is based on literature and/or years of experience with similar types of experiments.

Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be necessary.

It is currently impossible to exactly mention the number of mice required for these experiments over the next 5 years or per experiment. We have calculated the total number of mice based on experience over the past 5 years with similar type of experiments.

To that aim 40 mice are required for a complete and thorough analysis: 10 (number of mice per group) * 2 (different condition: with normal food/drink or RAAS inhibitor (i.e., losartan) diet/drink) * 2 (KO and WT mice). However, the (simultaneously) performance where two genes are involved, requires 80 mice and not less. Wild-type littermates of genetically modified mice are a better control group than normal bl/6 mice.

Therefore it is not possible to reduce the amount of wild-type mice in the case that we study two different knock-out mice. Here we will use a maximum of 4 different RAAS blockades: 40 (mice need per experiment) * 4 (RAAS blockades) * 3 (different mouse models of CKD: klotho KO mice, 1a-hydroxylase KO mice, or other available mice strain suitable for our research question) so in total we will use a maximum of 480 mice.

Importantly, before we will start our experiments we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe the experimental design, argue the number of animals in the experiments, describe (i.a.) human endpoints, alternatives, nature of discomfort and ethical considerations.

Experiments will only start upon IVD approval.

We will decide which CKD models are the most suitable strains and which RAAS blockade is the most effective, based on the primary outcome parameters (altered serum and urine urea, creatinine, calcium and phosphate concentrations).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus musculus	Own breeding & Commercial supplier	480	5-15 weeks old mice (adult male mice; unless indicated otherwise)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. In addition, prior to sacrifice, the animals will be anesthetized. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport. The genetically altered mice are well-established models of CKD.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like chronic kidney, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*. Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, cannot be mimicked in a lower animal species.

For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) it is a mammal; (2) physiology is more extensively characterized in mice than in other mammalian model species; (3) mice are amenable to transgenic manipulation; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. If necessary, because not all information is available, a pilot study will be performed to provide good data on variation and effect size of the proposed RAAS blockade intervention and the type of KO mice to use. If the pilot experiment generates unfavourable results, the actual experiment will not be performed (go/no-go). Based on provided calculations the minimum number of animals will be used for our experiments.

Alteration and blocking of RAAS from different sites might have a different effect on the FGF23-klotho-vitamin D axis. This, however, has not yet been tested and therefore in our research we would like to make use of RAAS blockades using angiotensin-converting-enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin-receptor blockers (ARB), renin inhibition and aldosterone blockade. Therefore all 4 types of RAAS inhibitors will be tested in DAP 1 and if the effect is similar in our primary outcome data, then we will only continue with ARB inhibitors. In DAP 1, RAAS blockades will be tested independently but as mentioned before we cannot reduce the amount of WT mice, since different littermates can act differently. There is published data from my thesis (chapter 5) showing the huge different effect of C57BL/6 mice and littermate mice. Hence the separate littermates for every KO mice are always essential.

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

In general, the discomfort of the mice is likely to be moderate.

In some cases, the combination of different mild experiments will lead to a higher degree of discomfort, which may be considered as moderate in combination. Often we will use diet/water intervention, genetically altered CKD models, blood sampling, housing in a metabolic cage for minimum possible days. Animal handling will be performed by skilled researchers and/or (bio)technicians at the animal facility to reduce the adverse effects due to stress.

Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired.

When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels.

When experiments will be performed with unknown (side)effects, a pilot will be performed prior to the actual study.

In short: all possibilities will be used to reduce pain, fear or suffering.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Preferably mice are group housed but in some cases this will not be possible:

Mice will be individually placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, and to determine food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Mice will get a RAAS blockade and this is incorporated with their food or water. It is still be possible to group house the mice.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Blood collection can be painful, but because of the stress and risk of death by anesthesia we will not use this, as is custom for blood collection. Anesthesia might have a possible effect on the parameter we want to measure in the blood.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The main adverse effects on welfare of the genetic modification is the development of CKD and involved side-effects hereof. Klotho KO and 1 α -hydroxylase KO mice will experience moderate discomfort due to the development of CKD. Therefore, KO mice are not bred unless needed for an experiment (a breeding DEC is necessary, and already approved for our department). Klotho KO mice do not grow normal and the size is half of the size of normal mice and their average survival is approximately 16 weeks. These mice are an accelerated model of ageing. 1-alpha hydroxylase KO mice are fragile due to lack of vitamin D and the bones are soft, therefore the chance of fractured bones is higher than in normal mice.

There is no side effect after administration of RAAS blockade in water/food. However, on the basis of clinical signs (appearance: fur and behaviour assessed daily, weight: more than 15% decrease of the initial bodyweight during experiment) mice will be removed from the study and will be sacrificed by a biotechnician or the responsible investigator. By monitoring the mice daily, we will make sure to exclude those mice from the study in a timely manner.

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include genetically altered mice to develop CKD, blood sampling, solitary housing (metabolic cages), and adverse effects from the interventions.

There will not be any surgical approaches in this subproject.

Explain why these effects may emerge.

- Development of CKD due to genetically altered model
- Solitary housing in metabolic cage
- Handling
- Collection of blood

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

The genetically modified mice are actually CKD models, therefore the discomfort they undergo cannot be prevented. They require a DEC to breed due to the discomfort. Klotho KO mice develop a hunch back in early life and die early (life length approximately 16 weeks). To minimize the number of animals experiencing discomfort due to phenotype, KO mice will only be bred when needed for an experiment, and in the quantity needed for the experiment.

The RAAS blockades incorporated to diet/water will not cause any discomfort.

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are housed solitary. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels.

Mice will be monitored closely. Daily inspection will take place, by the animal care takers of the animal facility and inspection by the responsible researcher. This may include animal behaviour, mice fur, body weight, colour of urine and other behavioural changes as a result of the induced intervention. When unexpected changes are found, the mice will be removed from the experiment to prevent further discomfort.

To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Prior to sacrifice, the animals will be anaesthetised.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for an humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like loosing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.
3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the CCD, DEC or IvD.
4. (Reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment.

5. Klotho KO and 1 α -hydroxylase KO mice are less tolerable to any intervention than normal mice and therefore those mice will be closely monitored and in the case of observed complications, they will be excluded from study. Hunchback and bone fractures are both humane endpoints which can be observed with these mice.

6. The objective of the experiment has been reached.

The responsible researcher will contact the Animal Welfare Body (IvD) if criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable then animal will be taken out of the experiment.

If criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the responsible researcher is not available, an animal caretaker or biotechnician has the obligation, (preferably after internal communication) to take the animal out of the experiment and euthanise it under general anaesthesia.

Indicate the likely incidence.

The incidence of humane endpoints due to genetic modification is present since specific CKD models of KO mice is being used in this procedure lead to discomfort; this is approximately 3-5%, according to previous experiments using klotho KO mice performed in our group.

Mostly, in case of dietary intervention/water intervention (RAAS blockades incorporated in food/water), the chance of reaching a humane endpoint is almost zero.

Metabolic cages for 48h periodically have also almost zero human endpoint.

Therefore, as half of the animals will develop CKD due to their KO phenotype, the chance of reaching a humane endpoint over the whole experiment is 1.5-2.5%.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

Due to either induction of CKD or the cumulative effect of mild procedures, 100% of the mice will experience moderate discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Mice are killed at the end of the experiment, to collect blood and organs.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Oxidative stress and FGF23, Klotho and vitamin D in CKD

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The aim of this project is to characterize the role of oxidative stress on the FGF23-klotho-vitamin D axis. We will use adult mice and pharmacological approach by using antioxidants to inhibit the oxidation (i.e vitamin E) for this purpose. These groups will consist of CKD mouse models (i.e. klotho KO mice, 1 α -hydroxylase KO mice, or other available mice strains) and will be given antioxidants, in either drinking water or incorporated with diet. Hence, the setup of groups might look like this:

- Wild-type mice + antioxidants (i.e vitamin E) incorporated in food/water
- Wild-type mice + normal food/water
- Transgenic CKD mouse model + antioxidants (i.e vitamin E) incorporated in food/water
- Transgenic CKD mouse model + normal food/water

Animals coming from the same family will be randomly distributed across the groups, we will then check the body weight because we want to be sure that we don't have one group with all the smallest/biggest animals. For this reason based on their body weight we correct the distribution of the animals when it is necessary. We don't expect to find any big differences since they have similar age.

To quantify the improved phenotype of CKD mice model after using antioxidants, several outcome parameters will be investigated.

The primary outcome parameters are serum and urine urea, creatinine and phosphate concentrations. Since CKD alleviation and its effect on the FGF23-klotho-vitamin D axis is the main outcome of our experiments, we will use several other additional parameters to determine this. We therefore will check the levels of FGF23, klotho and vitamin D in serum, kidney and urine of mice. To more thoroughly investigate the effect on kidney function we will check Glomerular Filtration Rate (GFR).

We will also study more in depth the effects on several proteins involved in the intracellular pathways involved in FGF23, klotho and vitamin D handling.

We will also determine the expression of Ca²⁺ and phosphate transporters in the intestines and kidney, as well as other transporters involved in renal ion homeostasis. There is great expertise in our department regarding this part.

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

We will use a genetic mouse model of CKD (i.e, klotho KO, 1 α -hydroxylase KO and others) and we will use antioxidants (e.g. vitamin E).

To study the effects of oxidative stress modulation on the FGF23-klotho-vitamin D axis in CKD, we will make use of antioxidants.

Before and during the animal experiments, the mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs at start, middle and end of the experiment) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood samples will be collected at

different time intervals (start, middle and end). This will allow us to follow serum phosphate concentrations over time to see how the antioxidant is effecting to inhibit CKD.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

The duration that animals will be in the experiment is different depending on the strain of mice (3 to 8 weeks). For instance klotho KO mice have short life span and therefore they will be shorter (3 to 4 weeks) in the experiment in comparison to the other strains of mice.

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

Subsequently in each individual experiment, independent statistic will be carried out by using power calculation as below, to reduce the amount of mice used to a minimum:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

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

Adult: max. 480

We will make use of adult mice (*mus musculus*). We will use KO mouse models of CKD, often of a C57bl/6 background as our previous data are generated using this strain, making our results easy to compare to previous results.

To study CKD, the mouse is a well-established model in this field of research and a lot of literature is available. Mice are a highly relevant model because it will support (or contradict) the currently widely adopted hypothesis that FGF23 is a novel target in chronic kidney disease. In addition, given the fact that our research questions are largely mechanistically and involves the study of renal tissue, the use of animals in this type of study is unavoidable. We will therefore make use of mice because 1) the mouse is well-established in this field of research and 2) the mouse offers superior genetic models to study the molecular genetic background of complex diseases. Furthermore, mice resemble the situation in humans with CKD much better than cultured cells. Therefore, *in vivo* studies in animals cannot be avoided.

By choosing male mice, the potential distribution due to hormonal influences, is kept as low as possible. It is currently not known whether changing levels of sex hormones may exert an influence on the regulation of calcium/phosphorus balance.

The number of mice per experiment will be based on statistical analysis (power analysis), our experience with similar type of experiments and/or (un)published data as below:

Quantitative analysis: prior to performing an experiment we perform statistical analysis to ensure that we use the minimum number of mice per group that will be statistically sound and biologically relevant.

Qualitative analysis (most of our experiments): the number is based on literature and/or years of experience with similar types of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be necessary.

It is currently impossible to exactly mention the number of mice required for these experiments over the next 5 years or per experiment. We have calculated the total number of mice based on experience over the past 5 years with similar types of experiments.

To that aim 40 mice are required for a complete and thorough analysis: 10 (number of mice per group) * 2 (different condition: with normal food/water or antioxidant (e.g. vitamin E) * 2 (KO and WT mice). However, the (simultaneously) performance where two genes are involved requires 80 mice and not less. Wild-type littermates of genetically modified mice are a better control group than normal bl/6 mice. Therefore it is not possible to reduce the amount of wild-type mice in the case that we study two different knock-out mice. Here we will use 2-4 different antioxidants, due to variation in the effects of antioxidants reported in the literature. Therefore: 40 (mice need per experiment) * 4 (antioxidants) * 3 (different mice model of CKD: klotho KO mice, 1a-hydroxylase KO mice, or other available mice strain suitable for our research question) so in total we will use a maximum of 480 mice.

Importantly, before we will start our experiments we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe the experimental design, argue the number of animals in the experiments, describe (i.a.) human endpoints, alternatives, nature of discomfort and ethical considerations.

Experiments will only start upon IVD approval.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Own breeding & commercial supplier	480	5-15 weeks old mice (adult male mice; unless indicated otherwise)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. In addition, prior to sacrifice, the animals will be anesthetized. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport. The genetically altered mice are well-established models of CKD.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like chronic kidney disease, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*. Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, can not be mimicked in a lower animal species.

For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) it is a mammal; (2) physiology is more extensively characterized in mice than in other mammalian model species; (3) mice are amenable to transgenic manipulation; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. If necessary, because not all information is available, a pilot study will be performed to provide good data on variation and effect size of the proposed antioxidant intervention. If the pilot experiment generates unfavorable results, the actual experiment will not be performed. Based on provided calculation the minimum number of animals will be used for our experiments.

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

In general, the discomfort of the mice is likely to be mild to moderate. In some cases, the combination of different procedures will lead to a higher degree of discomfort, which may be considered as moderate in combination. Often we will use diet/water intervention, genetically altered CKD models, blood sampling, housing in a metabolic cage for minimum possible days. Animal handling will be performed by skilled researchers and/or (bio)technicians at the animal facility to reduce the adverse effect.

Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired. When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels.
When experiments will be performed with unknown side-effects, a pilot will be performed prior to the actual study.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Preferably mice should be group housed but in some cases this will not be possible:

Mice will be individually placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, and to determine food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Mice will get an antioxidant and this is incorporated with their food or rarely water. It is still possible to group house the mice.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

G. Location where the animals procedures are performed

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The main adverse effects on welfare of the genetic modification is the development of CKD and involved side-effects hereof. Klotho KO and 1a-hydroxylase KO mice will experience moderate discomfort due to the development of CKD. Klotho KO mice do not grow normal and the size is half of the size of normal mice and average age expectation is approximately 16 weeks. These mice are an accelerated model of ageing and most of the

ageing symptoms are present. 1a-hydroxylase KO mice are fragile due to lack of vitamin D and the bones are soft, therefore the chance of fractured bones is higher than normal mice.

There is no side effect after administration of antioxidants. However, on the basis of clinical signs (appearance: fur and behavior assessed daily, weight: more than 15% of the initial bodyweight during experiment) mice might be removed from the study and will be sacrificed by a biotechnician or the responsible investigator. By monitoring the mice daily, we will make sure to exclude those mice from the study in a timely manner.

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include genetically altered mice to develop CKD, blood sampling, solitary housing (metabolic cages), and adverse effects from the interventions.

There will not be any surgical approaches in this subproject.

Explain why these effects may emerge.

- Development of CKD due to genetically altered model
- Solitary housing in metabolic cage
- Handling
- Collection of blood

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

The genetically modified mice are actually CKD models, therefore the discomfort they undergo cannot be prevented. They require a DEC to breed due to discomfort. Klotho KO mice develop a hunch back in early life and die early (life length approximately 16 weeks). To minimize the number of animals experiencing discomfort due to phenotype, KO mice will only be bred when needed for an experiment, and in the quantity needed for the experiment.

The antioxidants incorporated in food/diet will not cause any discomfort.

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are housed in solitary. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels.

Mice will be monitored closely. Daily inspection by the animal care takers of the animal facility and inspection by the responsible researcher. This may include animal behavior, mice fur, body weight, colour of urine and other behavioral changes as a result of the induced intervention. When unexpected changes are found, the mice will be removed from the experiment to prevent further discomfort.

To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians.

Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

[X] Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for an humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like losing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.
3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the CCD, DEC or IvD.
4. (Reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment.
5. Klotho KO and 1 α -hydroxylase KO mice are less tolerable to any intervention than normal mice and therefore those mice will be closely monitored and in the case of observed complications, they will be excluded from study. Hunchback and bone fracture are both humane endpoints which can be observed with these mice.
6. The objective of the experiment has been reached.

The responsible researcher will contact the Animal Welfare Body (IvD) if criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the animal will be taken out of the experiment.

If criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the responsible researcher is not available, an animal caretaker or biotechnician has the obligation, (preferably after internal communication) to take the animal out of the experiment and euthanise it under general anaesthesia.

Indicate the likely incidence.

The incidence of humane endpoints due to genetic modification is present since specific CKD models of KO mice are being used in this procedure lead to discomfort; this is approximately 3-5%, according to previous experiments using klotho KO mice performed in our group.

The chance of reaching an humane endpoint due to the antioxidant incorporated in the diet is almost zero.

Metabolic cages for 48h periodically have also almost zero human endpoint.

Therefore, the chance of reaching a humane endpoint is 1.5-2.5%.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

Due to either induction of CKD or the cumulative effect of mild procedures, 100% of the mice will experience moderate discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Mice are killed at the end of the experiment, to collect blood and organs.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure RAAS blockades, surgical model, and FGF23,Klotho and vitamin D in CKD

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The overall aim of this project is to characterize the role of RAAS on the FGF23-klotho-vitamin D axis. Some genetically altered animal models in our research question (i.e, FGF23 KO mice) are not a CKD model and therefore they need an extra approach, like 5/6x nephrectomy surgical approach to complete as a valid model. To that aim, next to genetic alteration, a surgical approach is necessary to have an appropriate model to study CKD. We will use adult genetically modified mice with pharmacological intervention using RAAS blockade. [Here, we will make use of the most effective RAAS blockades based on our primary outcome obtained in DAP1.](#) RAAS blockade will be given in either drinking water or incorporated with diet. Hence, the setup of groups will look like this:

- Sham operated KO mice + RAAS blockades in incorporated in food/water
- Sham operated KO mice + normal food/water
- 5/6X nephrectomy KO mice + RAAS blockades in incorporated in food/water
- 5/6X nephrectomy KO mice + normal food/water

- Sham operated WT mice + RAAS blockades in incorporated in food/water
- Sham operated WT mice + normal food/water
- 5/6X nephrectomy WT mice + RAAS blockades in incorporated in food/water
- 5/6X nephrectomy WT mice + normal food/water

Animals coming from same family will be randomly distributed across the groups, we will then check the body weight because we want to be sure that we don't have one group with all the smallest/biggest animals. For this reason based on their body weight we correct the distribution of the animals when it is necessary. We don't expect to find any big differences since they have similar age.

To quantify the improved phenotype of the surgically induced CKD mice after using RAAS blockades, several outcome parameters will be investigated.

The primary outcome parameters are serum and urine urea, creatinine and phosphate concentrations. Also other proteins might have an effect on the FGF23-klotho-vitamin D axis. Therefore we will check klotho and vitamin D levels in serum, kidney and urine of mice. To more thoroughly investigate the effect on kidney function we will check Glomerular Filtration Rate (GFR).

We will study more in depth the effects on several proteins involved in the intracellular pathways involved in FGF23, klotho and vitamin D handling. In addition, we will determine the expression of Ca²⁺ and phosphate transporters in the intestines and kidney, as well as other transporters involved in renal ion homeostasis. There is great expertise in our department regarding this part.

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

We will use a surgical approach (5/6X nephrectomy) to induce CKD in mice and we will use RAAS blockades, incorporated with diet or with drinking water.

The 5/6X nephrectomy consists in a ligation of the lower branch of the left renal artery to produce about one third area with visible renal ischemia; the upper pole of the left kidney is removed by cautery and the right kidney is decapsulated and nephrectomized to induce a total 5/6X nephrectomy. It is a severe surgery that can lead to weight loss/lack of weight gain, anemia, increase in blood pressure and kidney damage of course. Some animals can die during the experiments. To avoid discomfort during surgery, animals will be pre- and post-operatively supplied with analgesics (temgesic, due to the mainly hepatic elimination, this medication does not accumulate when renal function is compromised such as an ischemia injury) and surgery will be performed under anesthesia, while the animal rests on a heating mattress to maintain its body temperature. To aid a faster recovery of the mice after surgery, the animals will be placed in a heated incubator for 1,5 h. After the surgery pain killers will be injected every 12 hours for 2 days to reduce post-operative pain.

To study the effects of RAAS on the FGF23-klotho-vitamin D axis in CKD, we will use the most effective RAAS blockades [obtained from DAP1](#).

Before and during the animal experiments, mice will be housed in metabolic cages regularly (maximum of 1 period of 48hrs at start, middle and end) in order to collect faeces and urine, and determine food and water intake. Additionally, blood will be collected at different time intervals (start, middle and end). This will allow us to follow serum phosphate concentrations over time to see how RAAS blockade is effecting to inhibit CKD.

At the end of the experiment, the mice will be sacrificed under anesthesia by cervical dislocation. At this point blood is collected by eye extraction or heart puncture. Organs will be collected and used for subsequent analyses.

From the collected serum and urine we can measure the creatinine levels and there is a formula to measure GFR with that this will give us an indication how well a kidney is working.

The duration of animals will be in the experiment is 8 to 14 weeks in total; since after surgery we need some time that they develop CKD.

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

Subsequently in each individual experiment, independent statistic will be carried out by using power calculation as below, to reduce the amount of mice used to a minimum:

$$N = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

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

Adult: max. 360

Species and origin: We will make use of adult mice (*mus musculus*). We will use WT and KO mice, often of a C57bl/6 background as our previous data are generated using this strain, making our results easy to compare to previous results. The mice are obtained from our own breeding or from a commercial licensed breeder.

Choice of mice: To study CKD, the mouse is a well-established model in this field of research and a lot of literature is available. Mice are a highly relevant model because it will support (or contradict) the currently widely adopted hypothesis that FGF23 is a novel target in chronic kidney disease. In addition, given the fact that our research questions are largely mechanistically and involves the study of renal tissue, the use of animals in this type of study is unavoidable. We will therefore make use of mice because 1) the mouse is well-established in this field of research and 2) the mouse offers superior genetic models to study the molecular genetic background of complex diseases. Furthermore, mice resemble the situation in humans with CKD much better than cultured cells. Therefore, *in vivo* studies in animals cannot be avoided.

Choice of gender: By choosing the male mice, the potential distribution due to hormonal influences, is kept as low as possible. It is currently not known whether changing levels of sex hormones may exert an influence on the regulation of calcium/phosphorus balance.

Justification: The number of mice per experiment will be based on statistical analysis (power analysis), our experience with similar type of experiments and/or (un)published data as below:

Quantitative analysis: prior to performing an experiment we perform statistical analysis to ensure that we use the minimum number of mice per group that will be statistically sound and biologically relevant.

Qualitative analysis (most of our experiments): the number is based on literature and/or years of experience with similar types of experiments.

Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be necessary.

It is currently impossible to exactly mention the number of mice required for these experiments over the next 5 years or per experiment. We have calculated the total number of mice based on experience over the past 5 years with similar type of experiments.

For RAAS blockade experiment 80 mice are required for a complete and thorough analysis: 10 (number of mice per group) * 2 (different food/water: with normal food/water or RAAS inhibitor in food/water) * 2 (with sham operated or 5/6X nephrectomy operated) * 2 (KO and WT mice). However, the (simultaneously) performance where two genes are involved requires 160 mice and not less. Wild-type littermates of genetically modified mice are a better control group than normal bl/6 mice. Therefore it is not possible to reduce the amount of wild-type mice in the case that we study two different knock-out mice.

Given that we will study approximately 2 different KO mice and maximally 2 different RAAS blockades which this will make it: 80 mice per study * 2 genotypes * 2 inhibitors = 320 mice. Due to 10-15% post-surgery mortality we would like to have 40 extra mice in total. Given those reasons: we will have in total 360 mice for this experiment.

Importantly, before we will start our experiments we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe the experimental design, argue the number of animals in the experiments, describe (i.a.) human endpoints, alternatives, nature of discomfort and ethical considerations.

Experiments will only start upon IVD approval.

First we will use FGF23 KO mice to perform the experiment. However 5 years is a long time and there will be certainly new interesting genes for us to have another KO mice models. Therefore we would like to keep the possibility to be able to use another newly generated mice model. This model will be important and interesting to our research questions and potentially will help us in understanding more about the FGF23-klotho-vitamin D axis

in the CKD in the coming 5 years. In addition, according to the data obtained from DAP (subproject 1), we will decide which RAAS blockades are the most effective, based on the primary outcome parameters (altered serum and urine urea, creatinine, calcium and phosphate concentrations).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Own breeding & commercial supplier	360	5-15 weeks old mice (adult male mice; unless indicated otherwise)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Refinement

Some genetically altered animal models in our research question (i.e, FGF23 KO mice) are not a complete CKD model and therefore they need an extra approach to induce CKD. Among the available experimental models for CKD, the 5/6 nephrectomy has been a mainstay for studies of kidney disease and is performed by unilateral nephrectomy and removing the poles of the remaining kidney after one week from the first surgery [1,2]. 5/6 nephrectomy shows common features to CKD observed in humans [3]. It has been used to test new therapies [4,5] and has been proven to be clinically relevant [6]. A less invasive model like adenine treatment is also available which does not require surgery. The major disadvantage is that the adenine model produces a more severe form of bone disease than 5/6 nephrectomy does[7]. Here, we are looking at the effect of the FGF23-klotho-vitamin D axis, which are bone and kidney originated genes/hormones. Therefore, the adenine diet is not useful for our study. In addition, we performed a pilot study (██████████), to check whether chronic injection of Doxorubicin can lead to CKD in C57bl/6 mice. We selected C57bl/6

mice since most of our KO mice are generated in this mice strain. We found that this model is not severely inducing CKD and this model is not optimal to study CKD. Therefore using a surgical approach like 5/6 nephrectomy will be used to induce sufficient amount of CKD in a genetically altered mice model which are interesting to our research question.

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side-effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. In addition, prior to sacrifice, the animals will be anesthetized. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport. The surgically induced CKD is a well-established model of CKD.

Replacement

The use of animals is essential to understand the basis of human disease at the systems and whole organism level, and to provide a link between *in vitro* studies and clinical disease. For a multi-organ disease, like chronic kidney disease, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*. Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, cannot be mimicked in a lower animal species.

For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because:

- it is a mammal;
- physiology is more extensively characterized in mice than in other mammalian model species;
- mice are amenable to transgenic manipulation;
- a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

Reduction

A power calculation will be performed to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. If necessary, because not all information is available, a pilot study will be performed with the 5/6X nephrectomy technique and the intervention with RAAS blockades. If the pilot experiment generates unfavourable results, the actual experiment will not be performed. Based on provided calculation the minimum number of animals will be used for our experiments.

1. Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Johnson RJ. Nitric oxide modulates vascular disease in the remnant kidney model. *Am J Pathol.* 2002;161:239–248.
2. Santos LS, Chin EW, Ioshii SO, Tambara Filho R. Surgical reduction of the renal mass in rats: morphologic and functional analysis on the remnant kidney. *Acta Cir Bras.* 2006;21:252–257.
3. Kren S, Hostetter TH. The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int.* 1999;56:333–337.
4. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R. Losartan-hydrochlorothiazide association promotes lasting blood pressure normalization and completely arrests long-term renal injury in the 5/6 ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292:F1810–1818.
5. Terzi F, Burtin M, Hekmati M, Jouanneau C, Beaufils H, Friedlander G. Sodium restriction decreases AP-1 activation after nephron reduction in the rat: role in the progression of renal lesions. *Exp Nephrol.* 2000;8:104–114.
6. Waanders F, Vaidya VS, van Goor H, Leuvenink H, Damman K, Hamming I, Bonventre JV, Vogt L, Navis G. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system inhibition, dietary sodium restriction, and/or diuretics on urinary kidney injury molecule 1 excretion in nondiabetic proteinuric kidney disease: a post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis.* 2009;53:16–25.

7. Ferrari, Guaraciaba O; Ferreira, Juliana C; Cavallari, Raquel T; Neves, Katia R; dos Reis, Luciene M et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. (2014) BMC nephrology vol. 15 (1) p. 69

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

In general, [REDACTED]. 5/6X nephrectomy [REDACTED], but it is the known golden standard to induce CKD in mice. (in this DAP, the mice undergo to 5/6 nephrectomy have severe discomfort and the sham operated mice experience moderate discomfort).

Often we will use food/water intervention, surgically induced (5/6X nephrectomy) CKD models, blood sampling, housing in a metabolic cage for minimum possible days. Animal handling will be performed by skilled researchers and/or (bio)technicians at the animal facility to reduce the adverse effect.

Moreover, animals will be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired. When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

F. Accommodation and care

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Preferably mice should be group housed but in some cases this will not be possible:

Mice will be individually placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, and to determine food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Mice will get a RAAS blockade and this is incorporated in their food or water. It is still possible to group house the mice.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

The analgesic temgesic (0,05 mg/kg) will be administrated 15 minutes before the surgery and further anesthetized to stage 1.5% to 3.0% (percentage of isoflurane) by the inhalation of isoflurane (21% O₂; 68% N₂) in an induction chamber. During surgery time, animals will be in a temperature control bed. After the surgery the temgesic will be injected every 12 hours for 2 days to reduce post-operative pain according to normal procedure.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The adverse effects on welfare of the surgical approach mice model is the development of CKD and involved side-effects hereof.

The 5/6X nephrectomy consists of a ligation of the lower branch of the left renal artery to produce about one third area with visible renal ischemia; the upper pole of the left kidney is removed by cautery and the right kidney is decapsulated and nephrectomized to induce a total 5/6th nephrectomy. It is a severe surgery that can lead to weight loss/lack of weight gain, anemia, increase in blood pressure and kidney damage of course. Some animals can die during the experiments. To avoid discomfort during surgery, animals will be pre- and post-operatively supplied with analgesics (temgesic, due to the mainly hepatic elimination, this medication does not accumulate when renal function is compromised such as an ischemia injury) and surgery will be performed under anesthesia, while the animal rests on a heating mat to maintain its body temperature. To aid the mice recover after surgery, the animals will be placed for in a heated incubator for 1,5 h. After the surgery the pain killer will be injected every 12 hours for 2 days to reduce post-operative pain.

There is a 10-15% chance of post-surgical mortality.

There is no side effect after administration of RAAS blockades. However, on the basis of clinical signs (appearance: fur and behaviour assessed daily, weight: more than 15% of the initial bodyweight during experiment) mice might be removed from the study and will be sacrificed by a biotechnician or the responsible investigator. By monitoring the mice daily, we will make sure to exclude those mice from the study in a timely manner.

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include surgery to induce CKD, blood sampling, solitary housing (metabolic cages), and adverse effects from the surgery.

There is no phenotypical adverse effect of KO mice (i.e, FGF23) which will be used in this experiments.

Explain why these effects may emerge.

- Development of CKD due to surgical intervention (5/6X nephrectomy)
- Death due to surgery (10-15% chance)
- Solitary housing in metabolic cage
- Handling
- Collection of blood

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

The 5/6X nephrectomy results in severe discomfort. Mice will get pre- and post-surgical analgesics.

The RAAS blockades incorporated in food/water will not cause any discomfort.

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are housed solitary. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels.

Mice will be monitored closely. Daily inspection by the animal care takers of the animal facility and inspection by the responsible researcher. This may include animal behavior, mice fur, body weight, colour of urine and other behavioral changes as a result of the induced intervention. When unexpected changes are found, the mice will be removed from the experiment to prevent further discomfort.

To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for an humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like losing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when an animal shows other signs of discomfort such as bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.
3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the CCD, DEC or IvD.
4. (Reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment.
5. The objective of the experiment has been reached.

6. In 5/6x nephrectomy, by daily monitoring we will exclude and sacrifice mice which are slow in movements, feels in pain and in the case of observation blood in urine, in the case of observed fluid faeces.

The responsible researcher will contact the Animal Welfare Body (IvD) if criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the animal will not be taken out of the experiment.

If criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the responsible researcher is not available, an animal care taker or biotechnician has the obligation, (preferably after internal communication) to take the animal out of the experiment and euthanise it under general anaesthesia.

Indicate the likely incidence.

The 5/6x nephrectomy surgical approach, which is being used in this project proposal, might cause to an humane endpoint. The incidence is approximately 10-15%, according to previous experiments performed in [REDACTED].

The chance of reaching an humane endpoint due to the RAAS blockades is almost zero.

Metabolic cages for 48h periodically have also almost zero human endpoint.

The chance of reaching an humane endpoint due to the gene KO is almost zero (no adverse phenotype).

Therefore, the chance of reaching a humane endpoint is 5-7.5%.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

Due to the induction of CKD via a surgical procedure (5/6X nephrectomy), 50% of the mice will experience more discomfort. 5/6x nephrectomy has a 10-15% post-surgery mortality. So 5/6 nephrectomy will result in a severe discomfort.

Due to a sham-operation and the accumulation of procedures with a mild discomfort, 50% of the mice will experience moderate discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Mice are killed at the end of the experiment, to collect blood and organs.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix**Description animal procedures**

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 4	Type of animal procedure CKD induced calcification treatment with Mg2+

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Vascular calcification and atherosclerosis is mainly due to hyperphosphatemia and hypercalcemia. Magnesium as 'a natural calcium antagonist' is known to adjust the activity of calcium ions. In addition, vitamin D, fibroblast growth factor 23 (FGF-23), and klotho represent an endocrine axis involved in the regulation of calcium and phosphate metabolism. A rapidly increasing body of evidence supports involvement of the FGF23-klotho-vitamin D axis in vascular calcification. However, not so much information related to the effect of magnesium on FGF23-klotho-vitamin D axis levels in suppression or retardation of vascular calcification in CKD, is available. Therefore, here we propose to investigate the effect of magnesium on calcification in CKD mice models (e.g. klotho KO, 1 α -hydroxylase KO).

To investigate this, mice will be under a dietary intervention with magnesium. This diet contains either a normal or high amount of magnesium.

Groups are as below:

- Wild-type mice + high Mg²⁺ diet
- Wild-type mice + normal diet
- Transgenic CKD mouse model + high Mg²⁺ diet
- Transgenic CKD mouse model + normal diet

Animals coming from the same family will be randomly distributed across the groups, we will then check the body weight because we want to be sure that we don't have one group with all the smallest/biggest animals. For this reason based on their body weight we correct the distribution of the animals when it is necessary. We don't expect to find any big differences since they have similar age.

To quantify the improved phenotype of the CKD mice with high Mg²⁺ diet, several outcome parameters will be investigated.

The primary outcome parameters are serum and urine calcium, magnesium and phosphate concentrations. Serum magnesium values will be determined, as well as several markers for calcification. To determine the reduced calcification, calcium deposition, transdifferentiation of cells and apoptosis will be measured by applying quantification of calcium. Moreover, using metabolic cages differences in urinary excretion of magnesium, calcium and other ions (Na, K, ...) can be determined.

One other important outcome is to check the reduction in calcification of vascular smooth muscle cells and reduction in CKD stage. We will also determine the expression of Ca²⁺ and phosphate transporters in the intestines and kidney. In addition, we will check the level of FGF23, klotho and vitamin D levels in serum, urine and the kidneys of the mice. We will also study more in depth the effects on several proteins involved in the intracellular pathways involved in FGF23, klotho and vitamin D handling. There is a great expertise in our department regarding CKD and ion handling.

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

We will use a genetic mouse model of CKD (i.e, klotho KO and possibly others) and we will use high Mg²⁺ diet to reduce the calcification. Using dietary intervention, the effect of magnesium on vascular calcification in the WT and KO mice models of CKD (e.g. klotho KO) can be thoroughly assessed. Mice will get the magnesium in their diet. Blood samples will subsequently be collected at different time intervals (start, middle and end) to determine the concentration of the substance. Blood withdrawal will be performed by cheek puncture or via tail vein. This will also allow us to follow serum Ca²⁺ concentrations over time to see how Mg²⁺ is effecting to inhibit CKD. It is necessary that animals are housed in a metabolic cage in several stages of the experiment: at the start, middle and end of the experiment, to collect faeces and urine samples, and thus determine the concentration of the substance and/or metabolites. Finally mice will be sacrificed so organs and blood can be harvested. The organs are used for immunostainings, immunoblot and RNA isolations. The duration that animals will be in the experiment is different depending on the strain of mice (3 to 8 weeks). For instance, klotho KO mice have short life span and therefore they will be shorter (3 to 4 weeks) in the experiment in comparison to the other strains of mice.

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

Subsequently in each individual experiment, independent statistics will be carried out by using a power calculation as below, to reduce the amount of mice used to a minimum:

$$N = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

With a power of 80% and a significance of 5%, and specific variations per primary outcome parameter, the minimal amount of mice needed for a significant difference will result from this calculation.

B. The animals

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

Max. 150 adult mice.

We will make use of adult male mice (*mus musculus*). We will make use of mice which are genetically modified to develop CKD and vascular calcification (e.g. klotho KO). These mice are often of C57bl/6 background as our previous data are generated using this strain, making our results easy to compare to previous results. To study cardiovascular complications of CKD the mouse is a well-established model in this field of research and a lot of literature is available. In addition, given the fact that our research questions are largely mechanistically and involves the study of cardio/renal tissue, the use of animals in this type of study is unavoidable. We will therefore make use of mice because 1) the mouse is well-established in this field of research and 2) the mouse offers superior genetic models to study the molecular genetic background of complex diseases.

Furthermore, mice resemble the situation in humans with CKD much better than cultured cells. Therefore, *in vivo* studies in animals cannot be avoided.

By choosing to male mice, the potential distribution due to hormonal influences is kept as low as possible. It is currently not known whether changing levels of sex hormones may exert an influence on the regulation of calcium/phosphorus balance.

This year we only will use klotho KO mice, but we expect that this experiment will include approximately 2 to 3 different mouse strains as a CKD model. Given that approximately 40-50 mice per strain will be suitable therefore approximately 150 mice will suit this experimental design.

To reduce the amount of mice used to a minimum, we performed a very decent *in vitro* experiment as below: **In short: high phosphate is the hallmark of CKD and to mimic the calcification in CKD patients, human smooth muscle cells were incubated and cultured in high phosphate levels (3mmol) in the absence or presence of magnesium chloride (final concentration 2mmol). After 14 days, clear calcium phosphate deposits were observed under high phosphate conditions, which were completely absent in the cells co-cultured with high concentrations of mg2+.**

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mus Musculus	Own breeding & Commercial supplier	150	5-15 weeks old mice (adult mice; unless indicated otherwise)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Refinement

During the experiment the mice will be housed together in groups with free access to food and water. However, short periods of solitary housing in metabolic cages are necessary, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels. Before starting any experiment, extensive literature search and possibly a pilot-study will ensure that no sudden severe unwanted side effects arise during the experiment. To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. In addition, prior to sacrifice, the animals will be anesthetized. Moreover, our department is experienced in research regarding ion transport.

Replacement

For a multi-organ disease, like chronic kidney disease, there is no substitute for animal studies. It would be neither permissible nor ethical to carry out the necessary procedures in humans, and simulations cannot provide answers to the questions we seek to address. In addition, the simple conditions for ion transport *in vitro* are not able to reproduce the complex ionic (micro-) gradients encountered *in vivo*, therefore use of a mouse model is needed. Moreover, the complicated interplay of organs, in which regulatory mechanisms and hormonal regulation play a crucial role, cannot be mimicked in a lower animal species or cell models.

Reduction

Statistics will be used to determine the minimal amount of mice required to achieve significant differences in the primary outcome. When necessary, a pilot study will be performed to ensure that the results obtained from the study will be valuable. This will minimize the chances of having to re-perform a certain experiment. If the pilot experiment generates unfavourable results, the actual experiment will not be performed. Based on provided calculation the minimum number of animals will be used for our experiments. [Our *in vitro* data will reduce the amount of mice: instead of using mice and giving them a high phosphate diet, we performed this part *in vitro* to find out whether magnesium has any effect in the vascular calcification and after this observation we can directly test magnesium in the mice, we believe this is a part of reduction that reduced the amount of mice.](#)

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

In general, the discomfort of the mice is likely to be moderate.

In some cases, the combination of different mild experiments will lead to a higher degree of discomfort, which may be considered as moderate in combination. Often we will use diet/water intervention, genetically altered CKD models, blood sampling, housing in a metabolic cage for minimum possible days. Animal handling will be performed by skilled researchers and/or (bio)technicians at the animal facility to reduce the adverse effects due to stress.

Moreover, animals will only be housed together, unless when the collection of urine and faeces is desired.

When the mice are in the metabolic cages, they will be housed in the same room as the other mice to reduce stress levels.

When experiments will be performed with unknown (side)effects, a pilot will be performed prior to the actual study.

Repetition and Duplication

E. Repetition

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Preferably mice should be group housed but in some cases this will not be possible:

Mice will be individually placed in metabolic cages for a duration of 48 hours (24 hours adaptation, 24 hours collection) that is necessary for the collection of urine and faeces, and to determine food and water intake. To reduce the discomfort, the cages will be placed in the room together with the normal cages.

Mice will get a dietary intervention with high Mg²⁺ and this is incorporated in their food. It is still possible to group house the mice.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Blood collection can be painful, but because of the stress and risk of death by anesthesia we will not use this, as is custom for blood collection. Anesthesia might have a possible effect on the parameter we want to measure in the blood.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The main adverse effects on welfare of the genetic modification is the development of CKD and involved side effects hereof. Klotho KO and in the case of using 1 α -hydroxylase KO mice, both will experience moderate discomfort due to the development of CKD. Therefore, KO mice are not bred unless needed for an experiment (a breeding DEC is necessary, and already approved for our department). Klotho KO mice do not grow normal and the size is half of the size of normal mice and their average survival is approximately 16 weeks. These mice are an accelerated model of ageing. 1 α -hydroxylase KO mice are fragile due to lack of vitamin D and the bones are soft, therefore the chance of fractured bones is higher than in normal mice.

A magnesium-rich diet has been done before in our department and the amount and percentage is already optimized and no adverse effects are being reported.

On the basis of clinical signs (appearance: fur and behavior assessed daily, weight: more than 15% of the initial bodyweight during experiment) mice might be removed from the study and will be sacrificed by a biotechnician or the responsible investigator. By monitoring the mice daily, we will make sure to exclude those mice from the study in a timely manner.

In general, the procedures with expected adverse effects on welfare include genetically altered mice to develop CKD, blood sampling, solitary housing (metabolic cages), and adverse effects from the interventions. There will not be any surgical approaches in this subproject.

Explain why these effects may emerge.

- Development of CKD due to genetically altered model
- Solitary housing in metabolic cage
- Handling
- Collection of blood

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

The genetically modified mice are actually CKD models, therefore the discomfort they undergo cannot be prevented. They require a DEC to breed due to discomfort. Klotho KO mice develop a hunch back in early life and die early (life length approximately 16 weeks). To minimize the number of animals experiencing discomfort due to phenotype, KO mice will only be bred when needed for an experiment, and in the quantity needed for the experiment.

The Mg2+ incorporated to diet will not cause any discomfort.

Under normal circumstances, mice will be housed together in groups. Discomfort is mainly related to metabolic cages, in which they are housed in solitary. However, it is not possible to avoid the use of these cages, because of the necessity of the measurement of key parameters in the urine. When the mice are in metabolic cages they will be placed in the same room as the other mice, to reduce stress levels.

Mice will be monitored closely. Daily inspection by the animal care takers of the animal facility and inspection by the responsible researcher. This may include animal behavior, mice fur, body weight, colour of urine and other behavioral changes as a result of the induced intervention. When unexpected changes are found, the mice will be removed from the experiment to prevent further discomfort.

To obtain the best results possible, and reduce the amount of discomfort, mice will only be handled by skilled researchers and (bio)technicians. Prior to sacrifice, the animals will be anesthetized.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for an humane endpoint are:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment.
2. Mice will be excluded from the experiments and immediately euthanised under general anaesthesia in case of visible signs of complications or discomfort like losing weight which is more than 15% of the initial weight during experimental period. When these complications occur or when an animal shows other signs of discomfort such as hunchback and bad fur or does not respond adequately to stimuli (very slow in movements), they will be sacrificed.
3. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the CCD, DEC or IvD.
4. (Reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment.
5. Klotho KO are less tolerable to any intervention than normal mice and therefore those mice will be closely monitored and in the case of observed complications, they will be excluded from study.
Early hunch back phenotype is an humane end points which can be observed with these mice.
6. The objective of the experiment has been reached.

The responsible researcher will contact the Animal Welfare Body (IvD) if criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the animal will be taken out of the experiment.

If criteria 1, 2, 3, 4, 5 and/or 6 are applicable and the responsible researcher is not available, an animal care taker or biotechnician has the obligation, (preferably after internal communication) to take the animal out of the experiment and euthanise it under general anaesthesia.

Indicate the likely incidence.

The incidence of humane endpoints due to genetic modification is present since specific CKD models of KO mice is being used in this procedure lead to discomfort; this is approximately 3-5%, according to previous experiments using Klotho KO mice performed in our group.
The chance of reaching an humane endpoint due to the magnesium diet is almost zero.
Metabolic cages for 48h periodically have also almost zero human endpoint.
Therefore, the chance of reaching a humane endpoint is 1.5-2.5%.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

Due to either induction of CKD or the cumulative effect of mild procedures, 100% of the mice will experience moderate discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Mice are killed at the end of the experiment, to collect blood and organs.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0076
2. Titel van het project: The FGF23-klotho-vitamin D axis as a new instrumental target to combat the cardiovascular risk of chronic kidney disease.
3. Titel van de NTS: Het gebruik van de 'FGF23-klotho-vitamine D as' als middel om het cardiovasculaire risico van chronische nierziekte te bestrijden.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 23-04-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 12-05-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 18-05-2015 tot 28-05-2015 en van 24-06-2015 tot 10-08-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen n.v.t.
 - aanpassing aanvraag: 28-05-2015 en 10-08-2015
 - advies aan CCD: 07-09-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 18-05-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - 1.1 De titel is niet te begrijpen voor de doelgroep. De onderzoekers worden verzocht dit te herformuleren. Wat is een instrumentale doelstelling?
 - 3.1 De commissie mist een korte uitleg over FGF23 en klotho.
 - 3.5 De categorie matig tot ernstig bestaat niet meer. Zal 10% van de dieren ernstig ongerief ervaren?

- - 4.1 De onderzoekers stellen dat er grote overeenkomsten zijn tussen muis en mens. Kunnen zij duidelijker uitleggen wat ze daarmee bedoelen?
- **Project Proposal:**
 - 3.1 De FGF23-klotho-vitamine D as staat aan de basis van de projectaanvraag. Kunnen de onderzoekers beter uitleggen wat FGF 23 en klotho zijn, en waarom zij samen met vitamine D een as vormen? Voorts is niet duidelijk waarom klotho deficiëntie via verzwakking van FGF23 signaling in de nier leidt tot een toename in plaats van een afname van FGF23. De uitleg die in 3.2 bij de doelstelling wordt gegeven, zou beter toegevoegd kunnen worden aan 3.1, zodat de doelstelling logischer aansluit op de gegeven achtergrond.
 - 3.4.1 Dit is geen overall design c.q. stappenplan. Waarom willen de onderzoekers zowel genetische als chirurgische modellen voor CKD gebruiken? De rationale achter deze aanpak ontbreekt, terwijl het chirurgische model ernstig ongerief voor de dieren oplevert. De onderzoekers kunnen deze experimenten alleen doen indien zij dit afdoende onderbouwen. In het algemeen vertonen de onderdelen 3.4.1 en 3.4.2 een grote mate van overlap. De commissie geeft de aanvragers in overweging 3.4.1 vooral te gebruiken voor het schetsen van het overall design (zonder te specifiek te worden).
- **Description of Animal Procedures:**
 - DAP 1, onderdeel A eerste vraag: Waarom willen de onderzoekers het effect van meerdere remmers onderzoeken, terwijl zij allen zorgen voor blokkade van RAAS?
 - DAP 1, onderdeel A derde vraag: Op basis waarvan wordt het meest geschikte model gekozen uit de drie genetische modellen?
 - DAP 1, onderdeel B. De onderbouwing van het aantal dieren wordt gegeven bij onderdeel A derde vraag, terwijl zij bij onderdeel B gevraagd wordt. Het is niet duidelijk waarom deze experimenten gedurende 5 jaar elk jaar herhaald moeten worden.
 - DAP2, onderdeel A eerste vraag: Waarom is er onderzoek in het chirurgisch model nodig als dezelfde vraagstelling al in het genetische model wordt onderzocht?
 - DAP 2, onderdeel B: De onderbouwing van het aantal dieren wordt gegeven bij onderdeel A derde vraag, terwijl zij bij onderdeel B gevraagd wordt. De onderzoekers gebruiken dezelfde redenering als in dierproef 1, maar komen nu uit op 200 dieren in plaats van 400 dieren. Wederom is niet duidelijk waarom dit experiment gedurende 5 jaar elk jaar herhaald moet worden.
 - DAP2, onderdeel K. De commissie is van mening dat de muizen ernstig ongerief ervaren als gevolg van de 5/6 nefrectomie.
 - DAP 2, onderdeel J, laatste vraag: Op deze manier geformuleerd leidt de operatie altijd tot het humane eindpunt. De onderzoekers worden verzocht de eerste zin te herformuleren.
 - DAP 3, onderdeel A derde vraag: Op basis waarvan wordt het meest geschikte model gekozen uit de drie genetische modellen?
 - DAP 3, onderdeel B. De onderbouwing van het aantal dieren wordt gegeven bij onderdeel A derde vraag, terwijl zij bij onderdeel B gevraagd wordt. Voorts is het is niet duidelijk waarom deze experimenten gedurende 5 jaar elk jaar herhaald moeten worden.
 - DAP 4, onderdeel A tweede vraag: Hoe gaan de onderzoekers bloed afnemen bij de dieren? Deze informatie ontbreekt bij de beschrijving van de experimentele handelingen.
 - DAP4, onderdeel A derde vraag: Hier wordt uitgelegd waarom de onderzoekers het effect van Mg-suppletie willen onderzoeken. Deze informatie hoort thuis in onderdeel 3.1 van het onderzoeksvoorstel.
- Datum antwoord: 22-06-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**

- 1.1: Het gebruik van de 'FGF23-klotho-vitamine D as' als middel om het cardiovasculaire risico van chronische nierziekte te bestrijden.
- 3.1: FGF23 is een hormoon dat calcium en fosfaat reguleert, voornamelijk in de nieren en de bijnier. Klotho is essentieel voor de fosfaat balans in het lichaam en het reguleert de uitscheiding van fosfaat via FGF23-signalering.
- 3.5: Ernstig ongerief: 10% van de muizen.
- 4.1: Het is gebleken dat tijdens de evolutie, veel genen in de nieren, en dus ook eiwitten, hetzelfde zijn gebleven tussen muis en mens, zogenaamde conservering. Omdat de genexpressie en de daaropvolgende eiwitexpressie heel belangrijk zijn in onderzoek naar de nieren, kan de muis goed gebruikt worden als model voor de mens.

- **Project Proposal:**

- 3.1: When phosphate is in excess, FGF23 is secreted from bone and acts on the kidney to promote phosphate excretion into urine and suppress vitamin D synthesis, thereby inducing negative phosphate balance. One critical feature of FGF23 is that it requires Klotho, a single-pass transmembrane protein expressed in renal tubules, as an obligate coreceptor to bind and activate FGF receptors.

FGF23 seems to function as a protective factor, as it triggers adaptive changes that maintain a normal body phosphate homeostasis. Thus, modulation of the FGF23-klotho-vitamin D axis could represent a promising therapeutic target that might improve the fatal prognosis of patients with CKD and cardiovascular diseases. Assuming that the study goals are met and it is demonstrated that elevated FGF23 levels and/or klotho deficiency are important in the treatment of CKD patients, they can become novel targets in the treatment of CKD patients. Using magnesium as a novel treatment strategy, we aim to improve outcome in CKD patients suffering from vascular calcification. Therefore, by uncovering the molecular mechanism of Mg²⁺ and how it results in vascular calcification, we aim to increase awareness among clinicians to routinely measure magnesium in CKD, and if needed, give magnesium supplementation to CKD patients.

- 3.4.1: Some genetically altered animal models in our research question (i.e, FGF23 KO mice) are not a CKD models and therefore they need an extra approach like 5/6x nephrectomy surgical approach to complete as a valid model. To that aim next to genetic alteration, a surgical approach is necessary to have an appropriate model to study CKD.

- **Description of Animal Procedures:**

- DAP 1, onderdeel A eerste vraag: The renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) has a key role in the regulation of blood pressure, sodium and water balance, and cardiovascular and renal homeostasis. RAAS blockade using angiotensin-converting-enzyme inhibitors or angiotensin-receptor blockers is the cornerstone of treatment of renal disease. Alternative RAAS-blockade strategies include renin inhibition and aldosterone blockade. The effect of different RAAS blockades in FGF23, Klotho and vitamin D axes is not known. FGF23, Klotho and vitamin D axes can regulate differently when different parts like rennin, angiotensin-converting-enzyme, angiotensinreceptor or aldosterone is blocked. It is therefore important to investigate the effect of different blockade in FGF23, Klotho and vitamin. D axes. A better knowledge of the pathophysiology of the RAAS is crucial to fully understand the mechanisms of action of RAAS blockers and to exploit their renoprotective effects.

- DAP 1, onderdeel A derde vraag: We will decide which KO of CKD models are the most suitable strains, based on the primary outcome parameters (altered serum and urine urea, creatinine, calcium and phosphate concentrations) after RAAS blockade intervention. This will be tested via pilot study. *[this part shifted to DAP 1, onderdeel B as requested]*

- DAP 1, onderdeel B: The number of mice is based on a project duration of 5 years. Each individual study group will include on average 40 mice allowing for 2-4 parallel experiments where RAAS blockades will be used in CKD mice. Terminal experiments will be carried out at 2 or 3 time points. We will decide which KO of CKD models are the most suitable strains, based on the primary outcome parameters (altered serum and urine urea, creatinine, calcium and phosphate concentrations), after RAAS blockade intervention. To investigate RAAS and the FGF23-klotho-vitamin D axis in genetic CKD models, we expect to use 40 mice per experiment (approximately 4 groups of 10 mice). This is from several strains of WT and knock-out CKD mouse models. To reduce the amount of mice that will be used in total, first a pilot experiment will be carried out and for that we need 40 extra mice. So in total 440 mice is needed. Given those reasons: The estimated total number of mice is therefore $40 \text{ (mice)} * 2 \text{ (experiments)} * 5 \text{ (year)} = 400$.

- DAP2, onderdeel A eerste vraag: [also answered above] Some genetically altered animal models in our research question (i.e. FGF23 KO mice) are not a CKD models and therefore they need an extra approach like 5/6x nephrectomy surgical approach to complete as a valid model. To that aim next to genetic alteration, a surgical approach is necessary to have an appropriate model to study CKD.

- DAP 2, onderdeel B: The number of mice is based on project duration of 5 years. Each individual study group will include on average 80 mice allowing for 2-4 parallel experiments where RAAS blockades will be used in CKD mice. Terminal experiments will be carried out at 2 or 3 time points. To investigate RAAS and the FGF23-klotho-vitamin D axis in CKD models, we expect to use 40 mice per experiment (approximately 4 groups of 10 mice). Due to 10-15% post-surgery mortality we would like to have 40 extra mice in total. Given those reasons: The estimated total number of mice is therefore $40 \text{ (mice)} * 2 \text{ (experiments)} * 5 \text{ (year)} = 400$. So in total 440 mice is needed.

[REDACTED]

- DAP 3, onderdeel A derde vraag: *[this part shifted to DAP 3, onderdeel B as requested]*

- DAP 3, onderdeel B.: The number of mice is based on a project duration of 5 years. Each individual study group will include on average 40 mice allowing for 2-4 parallel experiments where antioxidant will be used in CKD mice. Terminal experiments will be carried out at 2 or 3 time points. We will decide which KO of CKD models are the most suitable strains, based on the primary outcome parameters (altered serum and urine urea, creatinine, calcium and phosphate concentrations), after an antioxidant intervention. To investigate pathways of oxidative stress and the FGF23-klotho-vitamin D axis in genetic CKD models, we expect to use 40 mice per experiment (approximately 4 groups of 10 mice). This is from several strains of WT and KO CKD mouse models. To reduce the amount of mice that will be used in total, first a pilot experiment will be carried out (with different mice strains) and for that we need 40 extra mice. Given those reasons: The estimated total number of mice is therefore $40 \text{ (mice)} * 2 \text{ (experiments)} * 5 \text{ (year)} = 400$. So in total 440 mice is needed.

- DAP 4, onderdeel A tweede vraag: Blood withdrawal will be performed by cheek puncture or via tail vein.

- DAP4, onderdeel A derde vraag: This part moved to onderdeel 3.1 now.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 24-06-2015

- Strekking van de vragen:

De onderzoekers wordt aangeraden nogmaals kritisch te kijken naar de engelse formuleringen en grammaticale fouten te verbeteren.

-NTS:

-3.5. Uit dierproef 2 blijkt dat 50 % van 440 muizen ernstig ongerief zullen ondervinden. Dit is 15% van het totaal aantal (1470) muizen. De onderzoekers worden verzocht de percentages aan te passen.

-Project proposal:

[Redacted content]

*Er worden meerdere RAAS blokkades gebruikt. Hoeveel RAAS blokkades willen de onderzoekers hanteren en waarop is de keuze voor dit aantal gebaseerd? Wanneer de onderzoekers meerdere blokkades tegelijk onderzoeken in één experiment, kunnen zij volstaan met minder controles. Kunnen de onderzoekers aangeven of zij dit zullen doen, of beredeneren waarom dit niet mogelijk is? Zijn in het laatste geval toch elke keer weer dezelfde controles noodzakelijk?

-DAP2, onderdeel A. Zullen deze experimenten alleen met de FGF23 KO (en WT als controle) worden uitgevoerd? Zo nee, kunnen de onderzoekers uitleggen waarom de andere KO-stammen nodig zijn?

-DAP3, onderdeel B. Om het aantal muizen tot een minimum te beperken, is een in vitro experiment uitgevoerd. Kunnen de onderzoekers toelichten om welk in vitro experiment het gaat en uitleggen hoe dit het aantal muizen tot een minimum beperkt?

DAP 2 en 3, onderdeel B. De aantallen dieren in de tekst en in de tabel komen niet overeen. De onderzoekers worden verzocht deze aantallen in overeenstemming met elkaar te brengen.

- Datum antwoord: 10-08-2015

- Strekking van de antwoorden:

- [REDACTED]

■ [REDACTED]

■ [REDACTED]

1. Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Johnson RJ. Nitric oxide modulates vascular disease in the remnant kidney model. *Am J Pathol.* 2002;161:239–248.

2. Santos LS, Chin EW, Ioshii SO, Tambara Filho R. Surgical reduction of the renal mass in rats: morphologic and functional analysis on the remnant kidney. *Acta Cir Bras.* 2006;21:252–257.
3. Kren S, Hostetter TH. The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int.* 1999;56:333–337.
4. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R. Losartan--hydrochlorothiazide association promotes lasting blood pressure normalization and completely arrests long--term renal injury in the 5/6 ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292:F1810–1818.
5. Terzi F, Burtin M, Hekmati M, Jouanneau C, Beaufils H, Friedlander G. Sodium restriction decreases AP--1 activation after nephron reduction in the rat: role in the progression of renal lesions. *Exp Nephrol.* 2000;8:104–114.
6. Waanders F, Vaidya VS, van Goor H, Leuvenink H, Damman K, Hamming I, Bonventre JV, Vogt L, Navis G. Effect of renin--angiotensin--aldosterone system inhibition, dietary sodium restriction, and/or diuretics on urinary kidney injury molecule 1 excretion in nondiabetic proteinuric kidney disease: a post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis.* 2009;53:16–25.
7. Ferrari, Guaraciaba O; Ferreira, Juliana C; Cavallari, Raquel T; Neves, Katia R; dos Reis, Luciene M et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head--to--head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. (2014) *BMC nephrology* vol. 15 (1) p. 69

- **Description Animal Procedures:**

-DAP 1, onderdeel B: Adult: max. 480

The number of mice per experiment will be based on statistical analysis (power analysis), our experience with similar type of experiments and/or (un)published data as below:

Quantitative analysis: prior to performing an experiment we perform statistical analysis to ensure that we use the minimum number of mice per group that will be statistically sound and biologically relevant.

Qualitative analysis (most of our experiments): the number is based on literature and/or years of experience with similar types of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be necessary.

It is currently impossible to exactly mention the number of mice required for these experiments over the next 5 years or per experiment. We have calculated the total number of mice based on experience over the past 5 years with similar type of experiments.

To that aim 40 mice are required for a complete and thorough analysis: 10 (number of mice per group) * 2 (different condition: with normal food/water or RAAS inhibitor in food/water) * 2 (KO and WT mice). However, the (simultaneously) performance where two genes are involved requires 80 mice and not less. Wild--type littermates of genetically modified mice are a better control group than normal bl/6 mice. Therefore it is not possible to reduce the amount of wild--type mice in the case that we study two different knock--out mice. Here we will use a maximum of 4 different RAAS blockades [each blockade may have a different effect]: 40 (mice need per experiment) * 4 (RAAS blockades) * 3 (different mouse models of CKD: klotho KO mice, 1 α --hydroxylase KO mice, or other

available mice strain suitable for our research question) so in total we will use a maximum of 480 mice in DAP1.

Importantly, before we will start our experiments we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe the experimental design, argue the number of animals in the experiments, describe (i.a.) human endpoints, alternatives, nature of discomfort and ethical considerations. Experiments will only start upon IVD approval.

-DAP 2, onderdeel B: Adult: max. 480

The number of mice per experiment will be based on statistical analysis (power analysis), our experience with similar type of experiments and/or (un)published data. It is currently impossible to exactly mention the number of mice required for these experiments over the next 5 years or per experiment. We have calculated the total number of mice based on experience over the past 5 years with similar type of experiments.

To that aim 40 mice are required for a complete and thorough analysis: 10 (number of mice per group) * 2 (different condition: with normal food/water or antioxidant (i.e., vitamin E in food/water) * 2 (KO and WT mice). However, the (simultaneously) performance where two genes are involved requires 80 mice and not less. Wild-type littermates of genetically modified mice are a better control group than normal bl/6 mice. Therefore it is not possible to reduce the amount of wild-type mice in the case that we study two different knock-out mice. Here we will use 2--4 different antioxidants, due to variation in the effects of antioxidants reported in the literature. Therefore: 40 (mice need per experiment) * 4 (antioxidants) * 3 (different mice model of CKD: klotho KO mice, 1 α -hydroxylase KO mice, or other available mice strain suitable for our research question) so in total we will use a maximum of 480 mice in DAP2.

Importantly, before we will start our experiments we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe the experimental design, argue the number of animals in the experiments, describe (i.a.) human endpoints, alternatives, nature of discomfort and ethical considerations. Experiments will only start upon IVD approval.

-DAP3, onderdeel B: Adult, max. 360.

The number of mice per experiment will be based on statistical analysis (power analysis), our experience with similar type of experiments and/or (un)published data. It is currently impossible to exactly mention the number of mice required for these experiments over the next 5 years or per experiment. We have calculated the total number of mice based on experience over the past 5 years with similar type of experiments.

For the RAAS blockade experiments 80 mice are required for a complete and thorough analysis: 10 (number of mice per group) * 2 (different food/water: with

normal food/water or RAAS inhibitor in food/water) * 2 (with sham operated or 5/6X nephrectomy operated) * 2 (KO and WT mice). However, the (simultaneously) performance where two genes are involved requires 160 mice and not less. Wild-type littermates of genetically modified mice are a better control group than normal bl/6 mice. Therefore it is not possible to reduce the amount of wild-type mice in the case that we study two different knock-out mice. Given that we will study approximately 2 different KO mice and maximally 2 different RAAS blockades which this will make it: 80 mice per study * 2 genotypes * 2 inhibitors = 320 mice. Due to 10--15% post-surgery mortality we would like to have 40 extra mice in total. Given those reasons: we will have in total **360** mice for this experiment.

Importantly, before we will start our experiments we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe the experimental design, argue the number of animals in the experiments, describe (i.a.) human endpoints, alternatives, nature of discomfort and ethical considerations. Experiments will only start upon IVD approval.

At this moment (this year) we are aiming to use *klotho*, 1α -hydroxylase and FGF23 KO mouse models. However, 5 years is a long time and there certainly will be new interesting genes for us to generate a new KO mouse model with that. Therefore we would like to keep the possibility to be able to use other newly generated mouse models. These models will be important and interesting to our research questions and potentially will help us in understanding more about the FGF23--*klotho*--vitamin D axis in CKD in the coming 5 years. This new KO mice must have a proofed/potential relations with FGF23, *klotho* and vitamin D, to be interesting to our research question.

Before starting the experiments, we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the choice of mice model, proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe the experimental design, argue the number of animals in the experiments, describe (i.a.) human endpoints, alternatives, nature of discomfort and ethical considerations. All the experiments will only start upon IVD approval.

Alteration and blocking of RAAS from different sites might have a different effect on the FGF23--*klotho*--vitamin D axis. This, however, has not yet been tested and therefore in our research we would like to make use of RAAS blockades using angiotensin--converting--enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin--receptor blockers (ARB), renin inhibition and aldosterone blockade. Therefore all 4 types of RAAS inhibitors will be tested in DAP 1 and if the effect is similar in our primary outcome data then we will only continue with ARB inhibitors. In DAP 1, RAAS blockades will be tested independently but as mentioned before we cannot reduce the amount of WT mice, since different littermates can act differently. There is published data from my thesis [REDACTED] showing the huge different effect of C57BL/6

mice and littermate mice. Hence the separate littermates for every KO mice are always essential.

-DAP3, onderdeel A. As mentioned above in DAP3, first we will use FGF23 KO mice to perform the experiment. However 5 years is a long time and there will be certainly new interesting genes for us to generate KO mice models. Therefore we would like to keep the possibility to use other newly generated mouse models. These models will be important and interesting to our research questions and potentially will help us in understanding more about the FGF23--klotho--vitamin D axis in CKD in the coming 5 years.

-DAP3, onderdeel B. An in vitro study has been performed and the data are very promising. In short: high phosphate is the hallmark of CKD and to mimic the calcification in CKD patients, human smooth muscle cells were incubated and cultured in high phosphate levels (3mmol) in the absence or presence of magnesium chloride (final concentration 2mmol). After 14 days, clear calcium phosphate deposits were observed under high phosphate conditions, which were completely absent in the cells co--cultured with high concentrations of mg²⁺.

This in vitro study will reduce the total amount of mice needed in our project proposal. It is no longer necessary to investigate whether magnesium has any effect on vascular calcification, during a high phosphate diet. Instead, we can directly test magnesium as a possible intervention for CKD.

-DAP 2 en 3, onderdeel B. The number of animals in the text and in the table are adjusted.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to gain more insight in the underlying mechanism involved in the development of CKD and its extra renal consequences in the vascular bed'. Dit onderzoeksdoel is onderverdeeld in vier daar logisch uit voortvloeiende subdoelen, namelijk 'to delineate the role of RAAS blockade on the FGF23-klotho-vitamin D axis',

'to delineate the effect of oxidative stress modulation on the FGF23-klotho-vitamin D axis', 'to unravel the role of deregulation of the FGF23-klotho-vitamin D axis in the increased cardiovascular risk of progressive CKD', en 'to unravel the underlying mechanisms involved in vascular calcification alleviation by magnesium'. Een verstoorde FGF23-klotho-vitamine D as is een risicofactor voor progressief nierfalen en brengt een sterk verhoogd risico op cardiovasculaire complicaties bij patiënten met chronische nierziekte (CKD) met zich mee. Bovendien hebben veranderingen in deze FGF23-klotho-vitamine D as effect op twee andere bekende risicofactoren, namelijk oxidatieve stress en activatie van het zogenaamde RAAS. Hoge Mg²⁺ concentraties in het serum lijken te beschermen tegen het verhoogde cardiovasculaire risico. De te behalen onderzoeksresultaten in muismodellen voor CKD zullen duidelijk maken wat de rol is van klotho, FGF23 en vitamine D in het verloop van CKD en in het ontstaan van vaatschade op andere plaatsen in het lichaam, en op welke manier Mg²⁺ vaatschade kan voorkomen. Voorts zal duidelijk worden of een farmacotherapie gestoeld op deze kennis het verloop van CKD en de daarbij optredende cardiovasculaire complicaties kan beïnvloeden bij muismodellen voor CKD. CKD kent een toenemende prevalentie in de bevolking. De DEC vindt het beschikbaar komen van nieuwe therapieën die het verloop van de ziekte en de ernst van de cardiovasculaire complicaties kunnen beïnvloeden van groot belang. Dit onderzoek kan daaraan bijdragen en vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot meer inzicht in de rol van klotho, FGF23 en vitamine D en de moleculaire mechanismen betrokken bij het verloop van CKD en het ontstaan van cardiovasculaire complicaties. Verder zal het effect van farmacotherapie gebaseerd op deze inzichten bij muizen onderzocht worden.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door het ontstaan van CKD en de gevolgen daarvan voor de dieren. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde bloedafnames en de toevoeging van bio-actieve stoffen aan het drinkwater of het voedsel in als licht. De herhaalde solitaire huisvesting gedurende 48 uur, het ontstaan van CKD in muizen met een genetische aanleg hiervoor, en de schijn-nefrectomie zullen naar verwachting matig ongerief veroorzaken. Het ongerief als gevolg van de 5/6 nefrectomie schat de commissie in als ernstig. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor 88% van de dieren en ernstig voor 12% van de dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Een ziekte waarbij meerdere organen zijn betrokken kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. Wanneer niet alle

informatie voor het berekenen van de benodigde groeps grootte bekend is, zal eerst een pilot experiment gedaan worden. Indien hieruit ongunstige resultaten blijken, zal het experiment niet uitgevoerd worden. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1470 muizen.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De commissie heeft de aanvrager tot twee keer toe kritisch bevraagd op de validiteit en noodzaak van het gebruik van het 5/6 nefrectomie model voor CKD, omdat dit model ernstig ongerief veroorzaakt. De commissie is er van overtuigd dat dit het juiste model is voor de voorgestelde dierproeven, dat het model alleen ingezet wordt in die delen van het project waar genetische modellen voor CKD niet gebruikt kunnen worden en dat in die gevallen minder belastende modellen ook geen uitkomst bieden. Verdere verfijning is op dit punt dus niet mogelijk. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Waar nodig wordt een pilot experiment gedaan om onbekende ernstige bijwerkingen zoveel mogelijk te voorkomen in het geplande experiment. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de rol van klotho, FGF23 en vitamine D op het verloop van CKD en het ontstaan van cardiovasculaire complicaties bij muizen, en in de moleculaire mechanismen die hierbij betrokken zijn. Die inzichten zouden aanleiding kunnen vormen om nieuwe therapeutische strategieën te ontwikkelen voor mensen met CKD. Het belang van meer inzicht in de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan van CKD en het beschikbaar komen van nieuwe interventies acht de DEC substantieel, gezien de toenemende prevalentie van CKD en de daarmee gepaard gaande cardiovasculaire complicaties in de bevolking.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 88% van de dieren matig en 12% van de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de inductie van CKD in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- 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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Geert Groteplein 10
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

Radboud universitair medisch centrum
Concernstaf, sectie Kwaliteit en Veiligheid

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

Geert Groteplein 10

www.radboudumc.nl

KvK 41055629/4

Datum
29 april 2015

Onderwerp
Factuurinformatie Projectaanvraag

Geachte CCD,

Hierbij sturen wij u de administratieve gegevens behorend bij de ingediende projectaanvraag. Wij verzoeken u de factuur te versturen naar [REDACTED] gemachtigde van de vergunninghouder. Hiervoor AUB het bij u bekend e-mailadres gebruiken [REDACTED]

Om verwerking door de financiële afdeling mogelijk te maken verzoeken wij u tevens **op de factuur** de volgende gegevens te vermelden:

Factuuradres: Radboudumc
28 F&A crediteuren
Postbus 9101
6500HB, Nijmegen
Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220
CDL projectnummer: 2015-0076
Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

Bij voorbaat dank.

Met vriendelijke groeten

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015240

Bijlagen

2

Datum 15 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015240. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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: 10 oktober 2015
Geplande einddatum: 10 oktober 2020
Titel project: The FGF23-klotho-vitamin D axis as a new instrumentaal target to combat the cardiovasc
Titel niet-technische samenvatting: De FGF23-klotho-vitamine D as als een nieuwe instrumentale doelstelling om het cardiov
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 10 september 2015



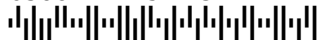
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015240

Bijlagen

2

Datum 15 september 2015


Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 15 september 2015

Vervaldatum: 15 oktober 2015

Factuurnummer: 15700240

Ordernummer: 2015-0076 / 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015240	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Contactpersoon

memo

Telefoonnotitie [redacted]
Betreft: AVD103002015240
Datum: 02-10-2015

Datum

Bijlagen

De aanvrager neemt in het onderzoek alleen manlijke dieren mee.

Het Secretariaat is het met de aanvrager eens dat [redacted]
[redacted]
[redacted]

Daar staat tegenover dat [redacted], het
Secretariaat een dilemma ziet [redacted]

[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]

[redacted] Hierover is met de onderzoeker telefonisch contact geweest.

Deze heeft verklaard dat [redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015240

Uw referentie

Bijlagen
1

16 OKT. 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 10 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The FGF23-klotho-vitamin D axis as a new instrumental target" met aanvraagnummer AVD103002015240. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "The FGF23-klotho-vitamin D axis as a new instrumental target" starten. De vergunning wordt afgegeven van 10 oktober 2015 tot en met 9 oktober 2020. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de periode tot en met 09 oktober 2020 de maximaal vergunbare periode van 5 jaar is. Er is niet aangevraagd om nieuwe genetisch gemodificeerde dieren te mogen fokken, creëren of houden. Er wordt vanuit gegaan dat dit geen onderdeel vormt van de projectaanvraag. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht. De CCD wil u graag attenderen op het gegeven dat er in uw projectaanvraag verhoudingsgewijs weinig in combinatie met in vitro studies of andere proefdierbesparende technieken wordt gewerkt, als deze studie wordt afgezet tegen andere projecten die de CCD onder ogen krijgt. De CCD wil graag benadrukken dat er een groot maatschappelijk belang wordt gediend als er blijvend wordt gewerkt aan van vernieuwende onderzoeksmethodes die een vermindering van ongerief en aantal proefdieren kunnen realiseren.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de

Datum
13-10-2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015240

wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag. Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief. Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang. Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


M. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 3101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 10 oktober 2015 tot en met 9 oktober 2020, voor het project "The FGF23-klotho-vitamin D axis as a new instrumental target" met aanvraagnummer AVD103002015240, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 september 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 september 2015, ontvangen op 10 september 2015

Datum
13-10-2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015240

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1: Type of animal procedure RAAS blockades, genetic model, and FGF23, Klotho and vitamin D in CKD	Muizen (<i>Mus musculus</i>) ook genetisch gemodificeerde muizen. Alleen manlijke dieren.	480	Matig	Zie opmerkingen
2: Type of animal procedure Oxidative stress and FGF23, Klotho and vitamin D in CKD	Muizen (<i>Mus musculus</i>) ook genetisch gemodificeerde muizen. Alleen manlijke dieren.	480	Matig	Zie opmerkingen
Type of animal procedure RAAS blockades, surgical model, and FGF23, Klotho and vitamin D in CKD	Muizen (<i>Mus musculus</i>) ook genetisch gemodificeerde muizen. Alleen manlijke dieren.	360	Ernstig	Zie opmerkingen
4: Type of animal procedure CKD induced calcification treatment with Mg2+	Muizen (<i>Mus musculus</i>) ook genetisch gemodificeerde muizen. Alleen manlijke dieren.	150	Matig	Zie opmerkingen

Opmerkingen

Alleen manlijke dieren worden gebruikt omdat er sexeverschillen in resultaten verwacht worden. Er is niet aangevraagd om nieuwe genetisch gemodificeerde dieren te mogen fokken, creëren of houden. Er wordt vanuit gegaan dat dit geen onderdeel vormt van de projectaanvraag. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

De CCD wil u graag attenderen op het gegeven dat er in uw projectaanvraag verhoudingsgewijs weinig in combinatie met in vitro studies of andere proefdierbesparende technieken wordt gewerkt, als deze studie wordt afgezet tegen andere projecten die de CCD onder ogen krijgt. De CCD wil graag benadrukken dat er een groot maatschappelijk belang wordt gediend als er blijvend wordt gewerkt aan van vernieuwende onderzoeksmethodes die een vermindering van ongerief en aantal proefdieren kunnen realiseren.

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD. In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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

Datum

13-10-2015

Onze referentieAanvraagnummer
AVD103002015240

waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Voorschriften

in verband met ernstig ongerief is een beoordeling achteraf vereist.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond. Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdooving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdooving 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 aanemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Datum
13-10-2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015240

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6. In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen. De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk januari 2021 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015241								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Acceptatiebrief				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	
12	Mail beschikking en vergunning 15-10-2015				x		x	x	



15 SEP. 2015

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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9

1.3 Vul de gegevens van het postadres in. *Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10
Postbus	9101
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
IBAN	NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	researcher	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 0 . 1 0 . 2 0 1 5
- Einddatum 1 0 . 0 4 . 2 0 1 9
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- prevention of infection around skin penetrating limb prostheses
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- voorkomen van wondinfecties rond prothesen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 10 - 10 - 2015

Handtekening [REDACTED]



Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> Higher education or training |
|-----|---|---|

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

Due to a congenital defect or a surgical amputation patients may be treated with an external prosthesis to regain functionality of the missing part of their body. Conventionally, an external prosthesis has a socket, which matches the shape of the residual stump and is attached to it by belts and cuffs, and/or by means of suction. Over the years, this kind of prostheses has improved the lives of amputees due to the technological advancements, allowing them to be more mobile and to better engage in an active lifestyle. However, socket prostheses are not without limitations, such as overload and irritation of the adjacent soft tissues, disuse osteoporosis in the residual limb, difficulty in ongoing socket fit due to weight fluctuations and muscular atrophy, and difficulty in fitting individuals with short residual limbs.¹

To overcome these limitations, an alternative for the stump-socket attachment is the bone-anchored percutaneous prosthesis, also known as the endo-exo prosthesis.² The technology is characterized by the fixation of the endo-device in the medullary canal of the femoral bone and the creation of a percutaneous exit-site for the attachment of the exo-limb prosthesis. The treatment of the bone-anchored prosthesis has significant advantages over the conventional design; it avoids stump irritation, and directly transfers loads from the external prosthesis to the human body, which leads to a significant improvement of the function of patients. The technique is rather successful, but during the recent years an increasing number of so-called "peri-implant" infections is observed.^{5,6} The treatment of the bone-anchored prosthesis has significant advantages over the conventional design; it avoids stump irritation, and directly transfers loads from the external prosthesis to the human body, which leads to a significant improvement of the function of patients. A comparative study of patients with trans-femoral amputation reported that 37% of patients with a socket prosthesis had restricted hip flexion compared with 0% patients with a bone-anchored prosthesis.⁷ In another study of 32 patients with upper or lower limb amputation, patients who had bone-anchored prostheses demonstrated significantly lower thresholds for detection of vibratory stimulation of the prosthetic limb compared with patients who had socket prostheses, indicating that the proprioceptive capacity of bone-anchored prostheses is larger than that of conventional socket ones.⁸ However, the drawback of percutaneous implants is the relatively high incidence of infections at the percutaneous passage, due to the damaged integrity of the skin, which otherwise forms a natural defense system against the ingress of bacteria and debris. The infection rate of the endo-exo prostheses is still very high based on the literature, e.g. reported to be between 13%–30%.⁹⁻¹² Although infection does not always lead to implant loosening, revision and/ or even removal of the implant, it still is a major cause of pain, medication, and prolonged hospital time for the involved patients. Although Aschoff and Juhnke¹³ reported that the prevalence of infections can be reduced by adjusting the shape of the prosthesis in 2012, exit-site infections remain one of the main complications for percutaneous devices¹⁴. The approach

we adopt in this study, i.e. using antibacterial patches and sleeves, will also be potentially applicable for the other types of percutaneous devices, such as permanent catheters, orthopaedic fixation devices, or drivelines for ventricular assist devices, etc.

The traditional strategy to combat such infections is the use of systemic antibiotic prophylaxis.^{15, 16} However, to achieve effective therapeutic drug concentrations in the infected area, there is a need of a high parenteral dose of antibiotics, which can cause systemic toxicity.¹⁷ Potential advantages of local delivery are obvious. Side-effects of systemic treatments are prevented and higher local more effective dosages are obtained near the infected site, thereby reducing the treatment duration.¹⁸ Currently, the major strategy for local drug delivery is a drug release system. ¹⁹ A drug release system is a device preferentially located at the peri-implant site with a sustained and high release of disinfectants, bacteriostatic drugs or antibiotics reaching effective concentrations.

Antimicrobial patches have already been applied earlier for the prevention of intravascular device-related bloodstream infection. ²⁴ However, the currently available patches are not ideal to be used around prostheses. For this research we want to exploit the electrospinning technique to produce materials that are very appropriate to use as a wound dressing material. Electrospun nanofibers for such application exhibit several useful properties, like a high oxygen permeability, high porosity, variable pore size distribution and a high surface-to-volume ratio that can promote haemostasis and absorb wound exudates. ²⁵ Furthermore, the morphology of electrospun nanofibres is similar to that of the natural extracellular matrix (ECM) in the skin and has been shown to promote cell adhesion, migration and proliferation.²⁵ The antibacterial patches will be electrospun with materials mixed with antibacterial drugs (). The patch that will be produced has a central fenestration and a side slit to facilitate easy application around percutaneous implants. It will be held in place with medical grade adhesive tape. For later use, patients can change the patches by themselves easily on a daily or weekly basis.

Similar to antibacterial patches, the sleeve will also deliver antibacterial agents to the percutaneous exit-site. The antibacterial sleeve will be placed over the implant at the time of surgery, and will be manually pushed through the subcutaneous tissue up to the area of the implant where tissue in-growth is expected. One of the advantages of the sleeve design is that it can be (re)placed after the implant has been inserted and thus does not interfere with prosthesis placement. The supposed efficacy of the sleeve approach is based on reports dealing with the use of antibacterial sleeves to prevent pin tract infection around external fixation pins as used for the stabilization of complicated bone fractures.^{26,27} Nevertheless, there are no commercially available antibacterial sleeves for percutaneous devices on the market yet. Moreover, the combination of patch and sleeves is not studied before, and this combination may produce better antibacterial effects.

Based on aforementioned, the aim of the project is to develop an effective strategy to prevent the occurrence of short as well as long term infections of percutaneous implants. The end goal is to provide a safe and cost-efficient treatment when using bone-anchored prostheses. As the presence of a permanent skin penetration provides a constant entrance for bacteria around percutaneous devices, the implants should be designed such that after wound healing a stable junction is created at the exit site of the bone-anchored limb prosthesis, which will then act as a barrier for bacterial ingress. In the current project, it is hypothesized that such a situation can be achieved by the application of an effective antimicrobial approach. Therefore, we intend to combine two approaches, i.e. an antimicrobial patch and sleeve, to guarantee long term efficacy for the bone-anchored implants.

References:

1. Isackson, D., L.D. McGill, and K.N. Bachus, Percutaneous implants with porous titanium dermal barriers: an in vivo evaluation of infection risk. *Med Eng Phys*, 2011. 33(4): p. 418-26.

2. Aschoff HH, Clausen A, and Hoffmeister T, The endo-exo femur prosthesis--a new concept of bone-guided, prosthetic rehabilitation following above-knee amputation. *Z Orthop Unfall* 147, 610, 2009.
3. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, and Ohlsson A, Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3, 81, 1969.
4. Branemark R, Branemark PI, Rydevik B, and Myers RR, Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res Dev* 38, 175, 2001.
5. Simonis P, Dufour T, and Tenenbaum H, Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of non-submerged dental implants. *Clin Oral Implants Res* 21, 772, 2010.
6. Badran K, Arya AK, Bunstone D, and Mackinnon N, Long-term complications of bone-anchored hearing aids: a 14-year experience. *J Laryngol Otol* 123, 170, 2009.
7. Hagberg K, Haggstrom E, Uden M, and Branemark R, Socket versus bone-anchored trans-femoral prostheses: hip range of motion and sitting comfort. *Prosthet Orthot Int* 29, 153, 2005.
8. Jacobs R, Branemark R, Olmarker K, Rydevik B, Van SD, and Branemark PI, Evaluation of the psychophysical detection threshold level for vibrotactile and pressure stimulation of prosthetic limbs using bone anchorage or soft tissue support. *Prosthet Orthot Int* 24, 133, 2000.
9. Aschoff, H.H., Juhnke, D.L., 10 Jahre endo-exo-femurprothetik zur rehabilitation nach Oberschenkelamputation—Daten, fakten und ergebnisse. *Z. Orthop. Unfallchir.* 150, 607–614,2012.
10. Aschoff, H.H., Kennon, R.E., Keggi, J.M., Rubin, L.E., Transcutaneous, distal femoral, intramedullary attachment for above-the-knee prostheses: an endo-exo device. *J. Bone Joint Surg. Am.* 92 (Suppl. 2), 180–186,2010.
11. Hagberg, K., Brånemark, R., One hundred patients treated with osseointegrated transfemoral amputation prostheses—rehabilitation perspective. *Rehabilitation* 46, 331–344,2009.
12. Tillander J, Hagberg K, Hagberg L, and Branemark R, Osseointegrated titanium implants for limb prostheses attachments: infectious complications. *Clin Orthop Relat Res* 468, 2781, 2010.
13. ASCHOFF, H. H.; JUHNKE, D. L. 10 Jahre Endo-Exo-Femurprothetik zur Rehabilitation nach Oberschenkelamputation–Daten, Fakten und Ergebnisse.*Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 2012, 150.06: 607-614.
14. Johannes Großhauser, Katja Reiter, Christian Große-Siestrup, et al. Bionic approach for the prevention of exit-site infections of percutaneous devices. *Tech (Berl)*. 2015 Jun 1;60(3):225-33.
15. Norden CW, Antibiotic prophylaxis in orthopedic surgery. *Rev Infect Dis* 13 Suppl 10, S842-S846, 1991.
16. Nasser S, Prevention and treatment of sepsis in total hip replacement surgery. *Orthop Clin North Am* 23, 265, 1992.
17. El Helou OC, Berbari EF, Marculescu CE, El Atrouni WI, Razonable RR, Steckelberg JM, Hanssen AD, and Osmon DR, Outcome of enterococcal prosthetic joint infection: is combination systemic therapy superior to monotherapy? *Clin Infect Dis* 47, 903, 2008.
18. Campbell AA, Song L, Li XS, Nelson BJ, Bottoni C, Brooks DE, and DeJong ES, Development, characterization, and anti-microbial efficacy of hydroxyapatite-chlorhexidine coatings produced by surface-induced mineralization. *J Biomed Mater Res* 53, 400, 2000.
19. Fu, R., et al., A novel electrospun membrane based on moxifloxacin hydrochloride/poly(vinyl alcohol)/sodium alginate for antibacterial wound dressings in practical application. *Drug Deliv*, 2014: p. 1-12.
20. Li, M., B. Han, and W. Liu, Preparation and properties of a drug release membrane of mitomycin C with N-succinyl-hydroxyethyl chitosan. *J Mater Sci Mater Med*, 2011. 22(12): p. 2745-55.

- [REDACTED]
- [REDACTED]
24. Hanazaki K, Shingu K, Adachi W, Miyazaki T, and Amano J, Chlorhexidine dressing for reduction in microbial colonization of the skin with central venous catheters: a prospective randomized controlled trial. *J Hosp Infect* 42, 165, 1999.
25. Charernsriwilaiwat, N., et al., Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing. *Int Wound J*, 2014. 11(2): p. 215-22.
26. Forster H, Marotta JS, Heseltine K, Milner R, and Jani S, Bactericidal activity of antimicrobial coated polyurethane sleeves for external fixation pins. *J Orthop Res* 22, 671, 2004.
27. Voos K, Rosenberg B, Fagrhi M, and Seligson D, Use of a tobramycin-impregnated polymethylmethacrylate pin sleeve for the prevention of pin-tract infection in goats. *J Orthop Trauma* 13, 98, 1999.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

From a functional point of view the percutaneous bone-anchored limb prosthesis has considerable advantages relative to the socket prosthesis, but the infection risk is relatively high and should be reduced to an acceptable level. The aim of the project is to develop an effective strategy to prevent the occurrence of short as well as long term infections of percutaneous implants. The end goal is to provide a safe and cost-efficient treatment when using bone-anchored prostheses.

The project relies on the cooperation of [REDACTED]

[REDACTED] Each group has an excellent (inter)national standing and ample contacts in their respective fields of work. The groups together comprise a considerable 'critical mass', illustrated by the presence of over 35 PhD students and post-docs.

The research program has an interdisciplinary character, using engineering approaches for medical purpose. It is based on cooperation in the fields of [REDACTED]. All experiments will be carried out within [REDACTED]. The project perfectly fits with ongoing research in these laboratories, which includes tissue engineering of bone, cartilage and meniscus, cell differentiation and culturing under dynamic culturing conditions, bioreactor technology and the development of advanced biomolecule delivery system by electrospinning and or other technologies. The combined laboratories possess all necessary equipment for this research, particularly three electrospinning apparatus to allow a large range of processing control. All animal studies will be performed in the [REDACTED], which is up-to-date facility, and equipped with relevant imaging facilities.

3.3 Relevance

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

It is expected that this research program will deliver relevant knowledge to prevent biomaterial-associated infection. All of those are among the strategic research under Roadmap Regenerative Medicine, Topsector Life Sciences Health. The project also fits the focus of Roadmap Pharmacotherapy, which includes a.o. "preventing hospitalization to contribute to cost efficiency of the healthcare system". The obtained knowledge of this project will be implemented in the design of an antibacterial product, which is beneficial for not only the bone-anchored limb prostheses, but also other types of bone-anchored percutaneous devices including bone-anchored hearing aids (BAHAs), pin tract devices for fracture healing and urine catheters.

3.4 Research Strategy

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

Antimicrobial patches and sleeves will be fabricated in this study. Antibacterial patches will be used as a potential wound dressing to prevent the infection around limb prosthesis. Antibacterial sleeves will be used as a second barrier to protect the skin-prosthesis interface. The key points of this project are proving efficacy (antibacterial property) and safety (biodegradability, biocompatibility, effect on wound healing) of the developed antibacterial materials in healthy conditions as well as in infected conditions. These materials are first tested in vitro to determine their mechanical and physiological properties, drug release kinetics, antibacterial properties, and cytocompatibility. The patches and the drugs concentration will have been optimized already in vitro before the start of the animal experiment.

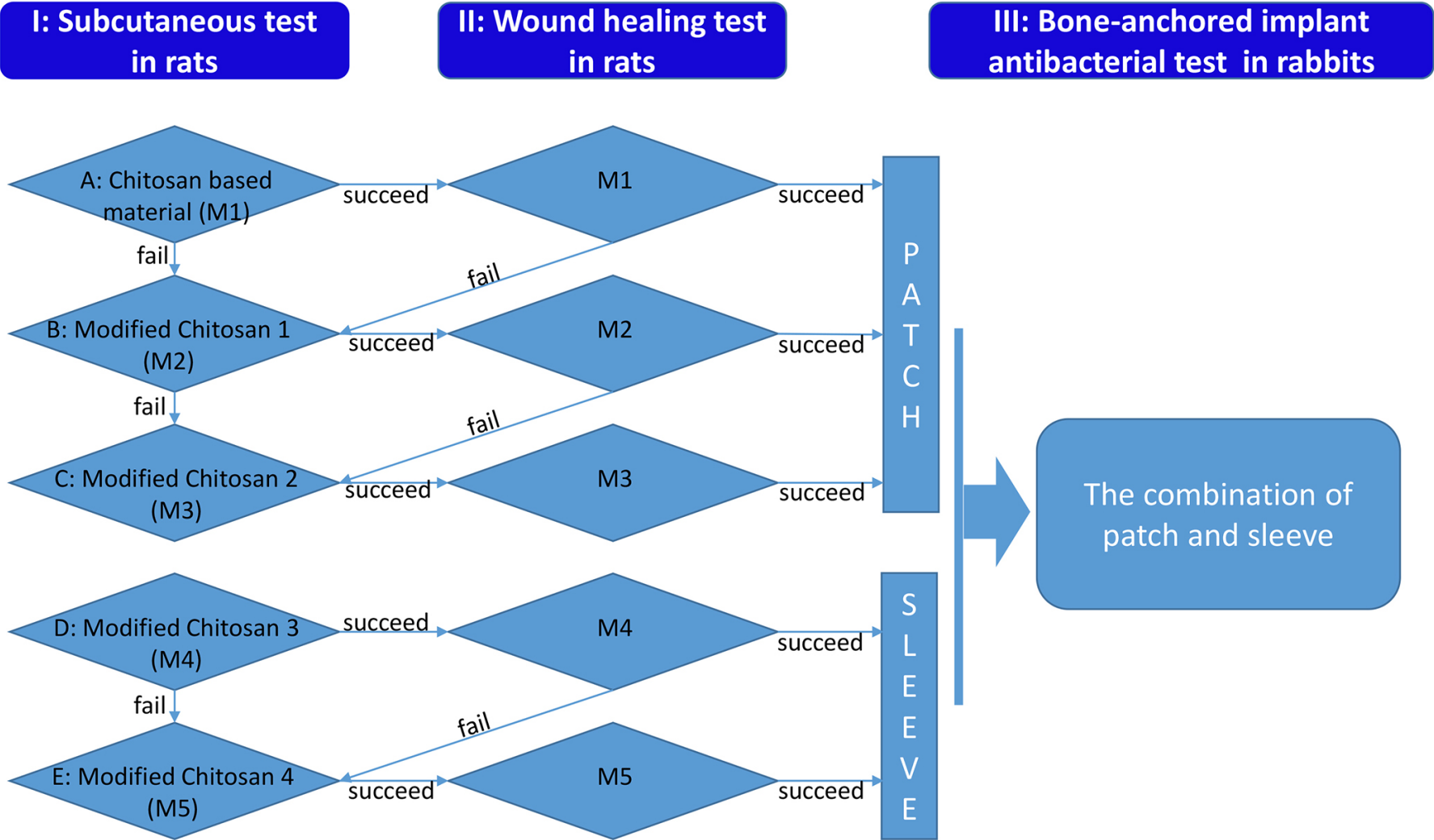
Based on the result of these in vitro studies, the materials with proper concentration of drugs will be further tested, to evaluate their in vivo antibacterial efficacy, and effect on wound healing.

The first step of the in vivo research strategy (after in vitro testing) is to evaluate the antibacterial property, biodegradability and biocompatibility of these materials in rats. When the material is proved to be biocompatible and effectively antibacterial, the wound healing test will be done to test effect on wound healing in rats. When both patch and sleeves are proved to reach our standard, they will be further tested in rabbits with bone-anchored implants to evaluate their long term antibacterial performance and tissue response. When in the 'lower animal species' one of the evaluated formulations does not live up to the requirements, this formulation in its current form will not be tested further until it is adjusted.

Three animal models will be used in this project based on the literature (shown in diagram):

1. Subcutaneous test in rats to test the antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility of materials [1, 2];
2. Wound healing test in rats to test its effect on wound healing process [3-6];

3. Bone-anchored implant antibacterial test in rabbits to evaluate tissue response and antibacterial efficacy in long term experiments [7, 8, 9].



The number of experiments is chosen based on the consideration that research may encompass with some risk of failure. We cannot try infinitely, but as a realistic number 5 is chosen as the limitation for this study. The experiment will be examined sequentially as shown in the diagram. The success criteria for test I is that the material shows antibacterial effect, acceptable biocompatibility and low biodegradability. The success criteria for test II is that the wound healing process is not inhibited compared to the sham group.

In test I, there are 4 groups, [REDACTED]. As a statistical replicate, we will take $n=6$. There are two defects per rat, one is used for biodegradability and biocompatibility assessment (without bacteria inoculation), the other for bacterial activity measurement (with bacteria inoculation). Therefore, the number of the animals maximally needed is 480 (5 studies \times 4 groups \times 6 samples \times 4 time points). In test II, [REDACTED]. Therefore, the number of the animals maximally needed is 120 (5 studies \times 4 groups \times 6 samples \times 4 time points / 4 wounds each rat). In test III, the group size ($n=18$) is based on literature. After the rat studies have given information about the spreading of the data on the antibacterial effect, we will recalculate whether this size can further be reduced. Here, the groups will be set as a combination of the successful patch and sleeve as follows: (1) no patch or sleeve (2) patch and sleeve (3) patch with drug (4) sleeve with drug, and (5) patch with drug and sleeve with drug. Therefore, the number of the animals maximally needed is 90 (1 study \times 5 groups \times 18 samples \times 1 time points).

Reference

1. Park, S.U., et al., The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials. *Int Wound J*, 2014. 11(1): p. 35-43.
2. Hart, E., et al., Efficacy of antimicrobial polymer coatings in an animal model of bacterial infection associated with foreign body implants. *J Antimicrob Chemother*, 2010.65(5): p. 974-80.
3. Xie, Z., et al., Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. *Acta Biomater*, 2013. 9(12): p. 9351-9.
4. van Rossum, M., et al., The influence of a PHI-5-loaded silicone membrane, on cutaneous wound healing in vivo. *J Mater Sci Mater Med*, 2007. 18(7): p. 1449-56.
5. Jiang, B., et al., Investigation of lysine acrylate containing poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels as wound dressings in normal and infected wounds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012. 100(3): p. 668-76.
6. Charernsriwilaiwat, N., et al., Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing. *Int Wound J*, 2014. 11(2): p. 215-22.
7. Chou, T.G., et al., Evaluating antimicrobials and implant materials for infection prevention around transcutaneous osseointegrated implants in a rabbit model. *J Biomed Mater Res A*, 2010. 92(3): p. 942-52.
8. Williams, D., R. Bloebaum, and C.A. Petti, Characterization of *Staphylococcus aureus* strains in a rabbit model of osseointegrated pin infections. *J Biomed Mater Res A*, 2008.85(2): p. 366-70.
9. Qu, H., et al., Percutaneous external fixator pins with bactericidal micron-thin sol-gel films for the prevention of pin tract infection. *Biomaterials*, 2015. 62: p. 95-105.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

There are three animal models in this project with different study purposes: 1) a subcutaneous implantation model in rats to assess antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility; 2) a dermal wound healing test to evaluate the effect on wound healing in rats; 3) a bone-anchored percutaneous implant model in rabbits to test the long term antibacterial efficacy and tissue response.

First, the subcutaneous model in rats is a commonly used model to test the antibacterial properties of materials in vivo. Maximally five antibacterial materials will be examined in five studies as is shown in the diagram in 3.4.1. Two separate pockets will be created bilaterally to place the test

materials subcutaneously. As reported in literature (Tillander, J. 2010; Chou, T.G, 2010; Darouiche, R.O, 2007; Williams, D.2008), the most common bacteria in superficial and deep cultures are *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Therefore, *S. aureus* is chosen in this experiment. 1×10^6 CFU of *S. aureus* will be inoculated randomly to one pocket to test the antibacterial efficacy, before suturing to close the wound (Emily Hart, 2010). After clinical signs of infection are evaluated and recorded, samples of the tissue around the incision, implanted materials and blood will be collected in preset time points (based on the in vitro drug release test result) to evaluate antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility by histological staining and microbiological methods. Bacteria and inflammatory cells in the tissue samples will be detected by Brown-Brenn modified Gram stain and hematoxylin and eosin (H&E). The Brown-Brenn stain was used to detect the presence of bacteria. The H&E stain is used for observing inflammation and fibrosis. The material sample in the infected pocket will be detected by microbiological method. Residual bacteria on the materials will be counted. The residual antibacterial property of the membranes will be tested to determine the efficient antibacterial duration by a Kirby-Bauer agar diffusion test, which is the most widely used antibacterial test. In Kirby-Bauer test, the materials will be placed on an agar plate inoculated with relevant bacteria. After 16 to 20 hours, there will be a transparent circle area around the material if the material has antibacterial effect. The size of the transparent area is correlated to the antibacterial efficacy. In this Kirby-Bauer test, we intend to evaluate whether the materials are still effective after predetermined time of in vivo experiment. This is important to know, as there is no antibacterial effect after the experiment, then this means that the patches should be replaced more frequently.

Second, the wound healing test is the most commonly used animal test for dermal wound studies. We foresee that maximally five antibacterial materials will be examined in this animal model as is shown in the diagram in 3.4.1. The wound area will be surgically created on the dorsum, and the potential test materials will be used to cover the wound area. The wound healing status will be detected at time points week 1, 2, 3, 4 using wound photography, histopathology and immunohistochemical methods.

Third, a rabbit model is used to further test the antibacterial efficacy and tissue response of combinations of sleeve and patch. This percutaneous animal model is commonly used to study the infection around implants. This animal model is used to detect the long term antibacterial efficacy and tissue response of the antibacterial patch and sleeve. The biocompatibility of the materials tested in rats is a representation of that in larger animals and humans. As we cannot use rats to perform the procedure described in the test III due to the size of implants, we have to choose larger animals, e.g. rabbits. Therefore, the implant will be planted on the rabbit tibia, and sleeves and/ or patches will be put around the implant to prevent infection. The patch and sleeve will be put individually or in combination. The sleeves and patches will be changed at certain time points based on clinical practice and the information of the rat test. 1×10^8 CFU of *S. aureus* will be inoculated at certain time point (e.g. from two weeks after operation and weekly after) until the end of the experiment (24 weeks). Clinical signs of infection, histological staining, and microbiology methods will be used to detect the long-term antibacterial property and tissue response of the materials by the technique shown in test I.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

The aim of the project is to develop an effective strategy to prevent the occurrence of short as well as long term infections of percutaneous implants. The end goal is to provide a safe and cost-efficient treatment when using bone-anchored prostheses. This antibacterial materials should obey to clinical requirements, such as being safe for the patient, sustaining release of drugs and having excellent handling properties to fit the work of the surgeon. To reach the main goal of this project, different components should be considered and tested in a series of animal experiments. First of all, the developed antibacterial material should live up to its expectations, providing a slow drug release speed and good mechanical properties. Second, the developed antibacterial materials should be proven biocompatible, with good wound healing effect in rodents, the most common used and 'lowest' animal species possible for the research of a promising wound dressing. When one of the evaluated formulations does not live up to the requirements in rodents, this formulation in its current form will not be tested further in bigger animals until it is adjusted. When the material is

proven biocompatible, and shows normal wound healing, and is living up to its expectations (long antibacterial duration and good mechanical properties), further research can be done on the rabbit bone-anchored implant model to gain the ultimate proof of principle.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Subcutaneous test in rats
2	Wound healing test in rats
3	Bone-anchored implant antibacterial test in rabbits

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Subcutaneous test in rats

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

In this project, we will start to test chitosan based materials, for the reason that chitosan and its derivatives are known antimicrobial agents against fungi, bacteria and viruses. As chitosan alone may not fulfil the requirements to successfully be used as patches or sleeves, we will further modify this material to 1) improve the mechanical properties, and 2) achieve a sustained release of drugs.

In this test, two separate pockets will be created bilaterally to place the test materials subcutaneously. As is reported in literature (Tillander, J. 2010; Chou, T.G, 2010; Darouiche, R.O, 2007; Williams, D.2008), the most common bacteria in superficial and deep cultures are *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Therefore, *S. aureus* is the only bacteria chosen in this experiment, because we prefer to work under carefully standardized tests and multi-bacterial compositions are hard to standardize. 1×10^6 CFU of *S. aureus* will be inoculated randomly to one pocket to test the antibacterial efficacy, before suturing to close the wound (Emily Hart, 2010).

After clinical signs of infection are evaluated and recorded, samples of the tissue around the incision, implanted materials and blood will be collected in preset time points (based on the in vitro drug release test result) to evaluate antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility by histological staining and microbiological methods. Bacteria and inflammatory cells in the tissue samples will be detected by Brown-Brenn modified Gram stain and hematoxylin and eosin (H&E). The Brown-Brenn stain was used to detect the presence of bacteria, and the H&E stain is used for observing inflammation and fibrosis. The material sample in the infected pocket will be detected by microbiological method. Residual bacteria on the materials will be counted. The residual antibacterial property of the membranes will be tested to determine the efficient antibacterial duration by a Kirby-Bauer agar diffusion test, which is the most widely used antibacterial test. In Kirby-Bauer test, the materials will be placed on an agar plate inoculated with relevant bacteria. After 16 to 20 hours, there will be a transparent circle area around the material if the material has antibacterial effect. The size of the transparent area is correlated to the antibacterial efficacy. In this Kirby-Bauer test, we intend to evaluate whether the materials are still effective after predetermined time of in vivo experiment. This is important to know, as there is no antibacterial effect after the experiment, then this means that the patches should be replaced more frequently.

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

Two separate pockets will be created bilaterally on the dorsum of the rats under [REDACTED] inhalation anesthesia to place the test materials subcutaneously. The implant area on the back is chosen to avoid as much as possible for the rats to bite or scratch the sutures and wound area. 1×10^6 CFU of *S. aureus* will be inoculated randomly to one pocket to test the antibacterial efficacy, before suturing to close the wound. During the surgery and post operation, the rats will receive analgesia (Rimadyl). The analgesia is used to give relieve to the rats. Although NSAIDs may have an influence on wound healing, this is the preferred method to closely mimic the clinical situation. After the procedure, the rats will be housed under standard conditions in groups. At the end of the experiment, rats will be euthanized at various time points (based on the in vitro study, 30 days in total). After clinical signs of infection are evaluated and recorded, samples of the tissue around the incision, implanted materials and blood

will be collected in preset time points (based on the in vitro drug release test result) to evaluate antibacterial efficacy (tissue sample from bacteria inoculation wound), biodegradability, and biocompatibility (sample from wound without bacteria inoculation) by histological staining and microbiological methods.

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

Sample size will be calculated in line with the requirements of the [REDACTED] and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis. Bilateral skin defects will be created per animal (i.e. both side of dorsal skin) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

Five different antibacterial materials will be examined in five studies in this animal model as is shown in the diagram in 3.4.1. There are 4 groups, namely the [REDACTED]. As a statistical replicate, we will take n=6. There are two defects per rat, one is used for biodegradability and biocompatibility assessment (without bacteria inoculation), the other for bacterial activity measurement (with bacteria inoculation). The rats will be euthanized at various time points (based on the in vitro study, week 1, 2, 3, 4). Therefore, the number of the animals maximally needed is 480 (5 studies × 4 groups × 6 samples × 4 time points).

Skeletally mature, Wistar or Sprague Dawley rats of both sexes will be used in this project. Rats are “the lowest species” used to test the antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility of biomaterials in subcutaneous models. From a scientific point of view, this study will show the in vivo performance of the antibacterial membranes in terms of their antibacterial efficacy, biodegradability, and biocompatibility.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Wistar or Sprague Dawley Rats, both sexes	registered breeder	480	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Refinement: This animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under standard inhalation anesthesia according to the protocol approved by [REDACTED]. At the end of surgery and post operation, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be unaltered.

Replacement: The tissue response to the materials must be assessed in a living organism before they are used clinically. The in vitro liquid test environment is not a replacement to an in vivo environment, in which body fluids (containing many proteins/enzymes), and cellular systems by cell-mediated processes that can affect the release of antibacterial drugs and the degradation of the antibacterial material. Animal studies are required to investigate tissue biocompatibility, biodegradability and efficacy / duration of the antibacterial effect.

Reduction: A power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable result. All developed antibacterial materials are tested to be sufficient in vitro on handling properties, i.e. mechanical properties, drug release characteristics, cytotoxicity before they are tested in vivo. Bilateral pockets will be created to reduce the total number of laboratory animals needed.

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

The surgical procedures will be done under [REDACTED] and peri-operative pain control medication will be given to the animals. The surgical site is specifically chosen on the dorsolateral site to have the least amount of stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected. Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

The [REDACTED] is used to mimic the clinical situation and give relieve to the rats although this may have an influence on wound healing. The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected. Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort (physiological changes: posture, gait, rapidity of breathing, increased heart rate; Behavioral changes: abnormal behavior such as jumping, freezing, squeaking, biting, escape behavior, pica-behavior, Hunched back, response to handling or other stimulus Response to hand clapping, aggressive behavior, vocalization (squeaking, whistling, screeching, and ultrasound)). If the animals show any signs above, appropriate actions will be taken under the instruction of experts.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

An adverse effect can be biting to the surgical sites. Besides, wound healing complications/ infection, stress from the procedures and handling may also occur.

Explain why these effects may emerge.

After skin surgery the healing process will start. The normal process will consist of moderate inflammation and subsequent tissue repair and remodel. This may cause wound area feeling itchy. Wound healing complications/ infection might occur due to bacteria incubation. Handling is a disturb procedure to their normal life.

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

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound and is not easy to reach even if the animal is awake; if the animals will try to bite the wound, a special designed bandage, [REDACTED], will be used to restrict the head to protect the wound area. The distress due to handling can be minimized by training to act skillfully. The infection will be minimized by using a proper concentration of bacteria.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Topical conditions: the existence of pus or the severe swelling of the wound area.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored. If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anaemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe decrease of motor function, causing distress.

Indicate the likely incidence.

Based on the literature (Hart Emily, 2010), the human endpoints stated in section J2 are less than 1% to occur. Historically we do not have animal loss or unexpected complications.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

As this is a relatively simple examination, the expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

After the experimental time the animals will need to be euthanized to collect the tissue samples.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Wound healing test in rats

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

A dermal wound healing test is the most commonly used animal test in wound dressing studies, and we could evaluate the wound healing effect of the materials very well through this method, so this is the most suitable animal model for our experiments. After the materials and drugs are optimised in vitro, five different antibacterial materials will be examined in five studies in this animal model as is shown in the diagram in 3.4.1. For each study, four groups (n=6) will be tested, [REDACTED]. Samples from the four groups will be assigned randomly to the four wounds on the dorsum of each rat. Dorsum is chosen to avoid bite or scratching. The wound healing status will be detected in certain time points (week 1, 2, 3, 4) by using photography, histopathology and immunohistochemical methods. The primary parameter is the wound healing speed based on photography. The second parameters are inflammatory cells, epithelial length, capillary density, granulation tissue thickness, collagen density.

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

Four full thickness skin wounds (extending to the panniculus carnosus) will be created on the back of the rats under standard animal facility inhalation anesthesia (isoflurane). The membranes from different groups [REDACTED] will be used to cover the four wounds randomly. Ring-shaped splints (Outer diameter 22mm, Inner diameter 12mm) will be used to prevent the wounds to constrict, and the wounds will be directly covered with different membranes and secured with 3M Tegaderm films. During the surgery and postoperative, the rats will receive painkillers (Rimadyl). The analgesia is used to mimic the clinical situation and give relieve to the rats although this may have an influence on wound healing. After the procedure, the rats will be housed individually to protect the wound for the whole remains of the experiment. The rats will receive a normal diet and there will be no special housing restrictions. The membranes will be changed at regular time points (based on the in vitro study, e.g. every 4 days) under anesthesia. The skin tissue will be collected after the rats are euthanized at the indicated time points (based on literatures {Lin, Carbohydr Polym,2013; Xie, Acta biomaterialia, 2013}, week 1, 2, 3, 4 because the wound will be healed in one month and we want to detect the wound speed in different time points). The wound healing status will be detected using wound photography, histopathology and immunohistochemical methods. The maximum time the rats will be in experiment is 30 days

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

Sample size will be calculated in line with the requirements of the [REDACTED] and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of

animals possible. Calculation will be done with a power analysis. Four skin defects will be created per animal (i.e. two on both side of dorsal skin) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

Five different antibacterial materials will be examined in five studies in this animal model as is shown in the diagram in 3.4.1. For each study, four groups (n=6) will be tested, [REDACTED]. Samples from the four groups will be assigned randomly to the four wounds on the dorsum of each rat. The rats will be euthanized at various time points based on literature (week 1, 2, 3, 4; n=6). Therefore, the maximum number of the animals in this test is calculated as 120 (5 studies × 4 groups × 6 samples × 4 time points / 4 wounds per rat). Skeletally mature, Wistar or Sprague Dawley rats of both sexes will be used in this project. Rats are the most commonly used animal species to test wound healing effect. From a scientific point of view, this study will show the in vivo performance of the antibacterial membranes in terms of wound healing effect. The wound healing status will be detected in certain time points (week 1, 2, 3, 4) using wound photography, histopathology and immunohistochemical methods.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Wistar or Sprague Dawley Rats, both sexes	registered breeder	120	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Refinement: This animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under standard inhalation anesthesia according to standard [REDACTED]. At the end of surgery and post operation, the animals will receive necessary painkillers. Housing conditions post surgery will be individual to protect the wounds. All the other living standards of the animals will be unaltered.

Replacement: The tissue response to the materials must be assessed in a living organism before they are used clinically. The in vitro liquid test environment is not a replacement to an in vivo environment, in which body fluids (containing many proteins/enzymes), and cellular systems by cell-mediated processes that can affect influence the release of antibacterial drugs and the degradation of the antibacterial material, which may have an influence on wound healing process.

Reduction: A power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment. All developed antibacterial materials are tested to be sufficient in vitro on handling properties, i.e. mechanical properties, drug release characteristics, cytotoxicity before they are tested in vivo. Multiple surgical sites will be created per animal, to reduce the total number of laboratory animals needed.

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

The surgical procedures will be done under standard [REDACTED], post-operative pain control medication will be given to the animals. The surgical sites are specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected. Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The animals need to be singly housed to prevent cagemates damaging the wounds, unfortunately we could do nothing to prevent this distress as this is a necessary need for the experiment.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

[X] Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

The standard [REDACTED] is used to mimic the clinical situation and give relieve to the rats although this may have an influence on wound healing process. The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected. Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort (physiological changes: posture, gait, rapidity of breathing, increased heart rate; Behavioral changes: abnormal behavior, pica-behavior, Hunched back, response to handling or other stimulus Response to hand clapping, aggressive behavior, vocalization (squeaking, whistling, screeching, and ultrasound)). If the animals show any signs above, appropriate actions will be taken under the instruction of experts.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

An adverse effect can be biting to the surgical sites. Besides, single housing will cause distress to the animals. Wound healing complications/ infection, and stress from the procedures and handling may also occur.

Explain why these effects may emerge.

After skin surgery the healing process will start. The normal process will consist of moderate inflammation and subsequent tissue repair and remodel. This may cause wound area feeling itchy. Wound healing complications/ infection might occur due to bacteria infection from environment. Single housing can cause distress because the rats are group animals. Handling is a disturb procedure to their normal life.

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

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound and is not easy to reach even if the animal is awake. Besides, if the animals try to bite the wound area, a special designed bandage, [REDACTED] will be used to restrict the head to protect the wound area.

The distress coming from single housing is unavoidable as this is a necessary in this animal model to protect the wounds. The distress due to handling can be minimized by training to be skilled.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored. If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anaemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleeding.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe decrease of motor function, causing distress.
8. Severe infection, such as pus in the wound area.

Indicate the likely incidence.

██, the humane endpoints stated in section J2 are less than 1% to occur. Historically we do not have animal loss or unexpected complications.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is estimated to be moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to the surgical intervention and recovery from anesthesia.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

After the experimental time the animals will need to be euthanized to collect the tissue samples.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Bone-anchored implant antibacterial test in rabbits

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Bone-anchored percutaneous test in rabbits is the most common used, and simplest bone anchored percutaneous animal model. The size of rabbit tibia is also suitable for the implant size, whilst rats would be too small. This animal model is mainly used to detect the long term antibacterial efficacy of the antibacterial patches and sleeves. The patches and sleeves will be put individually or in combination as experiment groups, and the patches and sleeves without drugs will be used as control. The infection status will be evaluated using clinical signs, microbiological methods, and histological staining. Clinical signs of infection will be evaluated weekly according to Checkette et al (R. G. Checketts, 2000). Blood and tissue samples around the implants will be analyzed using microbiological methods to confirm the bacteria infection. Tissue samples will also be histologically evaluated by Brown- Brenn modified Gram stain and hematoxylin and eosin (H&E). The Brown- Brenn stain is used to detect the presence of bacteria, and the H&E stain is used for observing inflammation and fibrosis.

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

Prefabricated titanium implants will be implanted laterally into the lower tibia of skeletally adult rabbits under [REDACTED]. The antibacterial materials will be used to prevent infection around the percutaneous implants. During the surgery and post operation, the rabbits will receive painkillers. The analgesia is used to mimic the clinical situation and give relieve to the rabbits although this may have an influence on wound healing. The antibacterial materials will be changed at certain time point (based on previous study). As is reported in literature (Tillander, J. 2010; Chou, T.G, 2010; Darouiche, R.O, 2007; Williams, D.2008), the most common bacteria in superficial and deep cultures are Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci, thus 1×10^8 CFU of Staphylococcus aureus will be inoculated at certain time point (from two weeks after operation and weekly after) to standardize the experiment until the end of the experiment. During the procedure, the rabbits will be housed individually to protect the wound from damaging by cagemates. Clinical signs of infection, basal life parameters(i.e. rectal temperatures) will be detected weekly under anesthesia by a modified Checketts Standard (R.G Checketts, 2000). When animals show infection signs of Grade II, they will be taken out of the experiment and euthanized. The rabbits will receive a normal diet and will have no other housing restrictions. After the rabbits are euthanized at Week 24, samples of tissue and blood will be collected to be used for histological and microbiological examination.

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

Sample size will be calculated in line with the requirements of the [REDACTED] and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of

animals possible. Calculation will be done with a power analysis. Bilateral bone implants will be used per animal (i.e. both side of tibia) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

In this test, the groups are a combination of the successful patch and sleeve as follows: (1) no patch or sleeve (2) patch and sleeve (3) patch with drug (4) sleeve with drug, and (5) patch with drug and sleeve with drug. As statistical replicate we chose n=18 based on literature. After the rat studies have given data on the spreading of the data on the antibacterial effect, we will recalculate statistical power to assess whether this size can further be reduced. Therefore, the number of the needed animals is maximum 90 (1 study × 5 groups × 18 × 1 time points). Skeletally mature, New Zealand rabbits of both sexes will be used in this project. The rabbits are the most common used species for this test, as the tibia size is suitable to the bone-anchored part of the implant (Ø2mm), but would be too large for a rat model. From a scientific point of view, this study will show the in vivo performance of the antibacterial membranes in terms of safety (tissue response) and efficacy (antibacterial properties) in a preclinical examination close to the human situation around a percutaneous limb prosthesis.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
New Zealand rabbits, both sexes	registered breeder	90	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Refinement: This animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under standard inhalation anesthesia according to the standard [REDACTED]. At the end of surgery and operation, the animals will receive necessary painkillers. Housing will be individual but all living standards of the animals will be unaltered.

Replacement: The tissue response to the materials must be assessed in a living organism before they are used clinically. The tissue response to the materials must be assessed in a living organism before they are used clinically. The in vitro liquid test environment is not a replacement to an in vivo environment, in which body fluids (containing many proteins/enzymes), and cellular systems by cell-mediated processes that can affect influence the release of antibacterial drugs and the degradation of the antibacterial material. Animal studies are required to investigate tissue biocompatibility and efficacy of the antibacterial effect.

Reduction: A power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment. All developed antibacterial materials are tested to be sufficient in vitro on handling properties, i.e. mechanical properties, drug release characteristics, cytotoxicity before they are tested in vivo. If possible, bilateral defects will be created to reduce the total number of laboratory animals needed.

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

The surgical procedures will be done under [REDACTED] and post-operative pain control medication will be given to the animals. The animals will be housed individually to prevent the cross infection and protect the surgical areas. The surgical sites are specifically chosen based on scientific literature, indicating no undesirable effects are expected. Animals will be checked by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems according to a modified Checketts standard (R.G Checketts, 2000), unexpected increase of distress, or an increased level of discomfort (e.g. physiological changes: posture, gait, rapidity of breathing, increased heart rate; Behavioral changes: abnormal behavior, pica-behavior, aggressive behaviors). Once the animals show any signs above, appropriate actions will be taken under the instruction of experts.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The animals need to be singly housed to prevent cagemates damaging the wounds, unfortunately we could do nothing to prevent this distress as this is a necessary need for the experiment.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

H. Pain and pain relief

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

The standard [REDACTED]) will be used and distress after the intervention is not predictable. The analgesia (Rimadyl) is used to mimic the clinical situation and give relieve to the rabbits although this may have an influence on wound healing process. The surgical sites are specifically chosen; therefore, no undesirable effects are expected. Animals will be checked by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems according to a modified Checketts standard (R.G Checketts, 2000), unexpected increase of distress, or an increased level of discomfort (e.g. physiological changes: posture, gait, rapidity of breathing, increased heart rate; Behavioral changes: abnormal behavior, pica-behavior, aggressive behavior). If the animals show any signs above, appropriate actions will be taken under the instruction of experts. Once the humane end point is reached, the animal will be euthanized.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The severe infection of implant area might happen. Besides, single housing, stress from the procedures and handling may also occur.

Explain why these effects may emerge.

Anti-infection is the main purpose of this study. The infection around the implant is created by bacteria incubation after the implant is planted surgically to that area. If the infection gets out of control, the severe infection may happen. Single housing can cause distress because the rabbits are group animals. Handling is a disturb procedure to their normal life.

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

To avoid discomfort, analgesic medication will be given to the animals. The concentration of bacteria will be based on the literature and previous experience. A pilot study will be conducted to evaluate the safety of that concentration. Animals will be checked daily to detect the abnormal behavior and weekly under anesthesia by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of infection. Once there is infection above grade 2 (according to a modified Checketts standard {R.G Checketts, 2000}, shown in the human endpoint), the animals will be euthanized. The distress coming from single housing is unavoidable as this is a necessary in this animal model to protect the wounds. The distress due to handling can be minimized by training to act skilled.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Topical conditions in the wound area:

The animals with infection grade 2 will be euthanized. Pin tract infections will be evaluated using a modified Checketts et al (R.G Checketts, 2000). Classification method for animal experiments: Grade 0 corresponds to "no redness," in which neither redness, discharge, nor pin loosening is observed. Grade 1 corresponds to infections only in the soft tissue, characterized by redness and discharge around the pin without pin loosening. Grade 2 corresponds to infections in both soft and hard tissues, characterized by redness and discharge around the pin associated with pin loosening due to osteomyelitis.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored. If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anaemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe decrease of motor function, causing distress.

Indicate the likely incidence.

The conditions of the humane endpoints stated in section J2 are approximately 20%-40% to occur (1 to 2 out of 5 groups without drugs * 100% expected incidence of humane end-points). Because this may happen to the control and the experiment group without antibacterial drugs, and once signs of Grade 2 clinical infection manifest in any implant, at which point the animal will be euthanized.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The expected level of discomfort is moderate to severe. This level of discomfort is most likely to occur in the days after the surgery due to recovery from anesthesia and due to bacterial infection in the late stage. [The estimated percentage of animals experiencing severe distress is maximally 40% \(2 out of 5 groups\)](#). Once this severe discomfort occurs the animals will be taken out of the test, i.e. if the infection status is above grade 2, the animal will be euthanized. [The rest of animals \(minimally 60%\) are expected to experience moderate distress.](#)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

After the experimental time the animals will need to be euthanized to collect the tissue samples.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0072
2. Titel van het project: Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses.
3. Titel van de NTS: Voorkomen van wondinfecties rond prothesen.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 21-05-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-06-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-06-2015 tot 22-06-2015 en van 13-07-2015 tot 14-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-06-2015 en 14-07-2015
 - advies aan CCD: 04-09-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-06-2015
 - Strekking van de vragen:
 -
 - **Project Proposal:**
 - -3.1. De projectaanvraag is gebaseerd op de noodzaak tot vermindering van de infectiefrequentie van endo-exoprothesen, omdat deze infecties kunnen resulteren in verlies van het implantaat. Uit de studie waarnaar de onderzoekers verwijzen (9) blijkt inderdaad dat 18% van de 39 patiënten een infectie doormaakt, maar dit resulteert niet per definitie in verwijdering van het implantaat. Hebben de onderzoekers meer voorbeelden van studies waaruit blijkt dat endo-exo femurprothesen vaak verwijderd moeten worden door het

optreden van infecties? In een artikel uit 2012 (Aschoff en Juhnke) schrijft de ontwerper van de techniek 'Initially high rates of infection could be dramatically reduced through a change in design of the skin-penetrating parts'. Kennelijk kan de prevalentie van infecties afnemen door de vorm van de prothese aan te passen. De commissie ziet voornamelijk in de gegeven achtergrond te weinig onderbouwing voor het klinische probleem en voor de voorgestelde (belastende) dierexperimenten. De onderzoekers worden verzocht deze onderbouwing te versterken.

- -3.4 Indien de oplosbaarheid in het lichaam en de 'biocompatibiliteit' van de onderzochte materialen onvoldoende is, hoeft het effect van de materialen op wondgenezing niet bepaald te worden. De commissie verzoekt de onderzoekers een fasering in de volgorde van de testen aan te brengen, opdat materialen niet onnodig in het wondgenezingsexperiment getest worden.
- -3.4.2.
- *De onderzoekers schrijven dat zij 5 verschillende antibacteriële materialen willen onderzoeken. Waarom kiezen zij voor dit aantal, hoe verschillen zij en worden deze gelijktijdig of sequentieel onderzocht?
- *Kunnen de onderzoekers duidelijker uitleggen wat Kirby-Bauer testen inhouden en waarom zij deze willen toepassen?
- *De biocompatibiliteit van de materialen wordt eerst in ratten getest, waarna de materialen in konijnen worden getest. Is de biocompatibiliteit voor konijnen naar verwachting hetzelfde als voor ratten? De onderzoekers worden verzocht dit beter toe te lichten.
- *Een ander aspect van de aanvraag betreft de antibacteriële werking van de materialen al dan niet in combinatie met antimicrobiële agentia. Welke bacteriestammen willen de onderzoekers gebruiken en zijn dit dezelfde als de bacteriën die in de kliniek de meeste problemen geven bij endo-exoprothesen?
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP1, onderdeel B. Er worden 4 huidlaesies aangebracht op de rug van elke rat. Het effect op wondgenezing van 5 materialen in 4 condities wordt onderzocht. Kunnen de onderzoekers duidelijker opschrijven welke materialen en welke condities per rat onderzocht zullen worden?
- -DAP2, onderdeel B. Er worden twee onderhuidse pockets aangebracht per rat om de biocompatibiliteit en het antibacteriële effect van het materiaal te onderzoeken. Kunnen de onderzoekers duidelijker opschrijven welke materialen en welke condities (geen materiaal, materiaal zonder bacteriën, materiaal met bacteriën) per rat onderzocht zullen worden?
- -DAP2, onderdeel A. Op grond van welke criteria worden de antibacteriële materialen gekozen voor deze dierstudie? De onderzoekers zullen bijvoorbeeld *S. Aureus* gebruiken om de materialen mee te infecteren. Waarop is de keuze voor deze stam gebaseerd, en welke andere bacteriën willen de onderzoekers mogelijk gebruiken? Hebben de onderzoekers overwogen om een multi-bacterieel preparaat te gebruiken waarin de bacteriestammen vertegenwoordigd zijn die pathologie bij patiënten veroorzaken? Om het antibacteriële effect van de onderzochte materialen te kwantificeren zullen de onderzoekers de overgebleven bacteriën in het membraan tellen en de overgebleven antibacteriële werking van de membranen zal in zgn. Kirby-Bauer tests worden bepaald. De commissie wil graag weten of deze methodes al eerder gebruikt zijn door deze onderzoekers en of de antibacteriële werking hiermee goed te kwantificeren is.

- -DAP3, onderdeel A, tweede vraag. De onderzoekers vermelden niet welke bacteriën ze willen gebruiken en waarom deze stam(men). Zij worden verzocht dit toe te voegen. Voorts wordt niet duidelijk welk aantal bacteriën op basis van eigen onderzoek of de literatuur hiervoor gebruikt zal worden. Hebben de onderzoekers wel ervaring met het aanbrengen van infecties bij dit konijnenmodel? Op welke tijdstippen tot 24 weken willen de onderzoekers hoeveel konijnen doden? In de berekening van het aantal dieren wordt geen rekening gehouden met het doden van dieren op verschillende tijdstippen.
- -DAP3, onderdeel B. Kunnen de onderzoekers duidelijker opschrijven welke condities zij precies in elk konijn gaan onderzoeken? De benodigde groepsgrootte varieert van 8 tot 18 dieren. Waarom varieert dit zo sterk? Indien de onderzoekers kunnen volstaan met groepen van 8 dieren dan levert dit een grote reductie van het benodigde aantal dieren op.
- -DAP3, onderdeel K. De konijnen worden pas uit het experiment gehaald indien de infectiestatus 'Grade 2' overstijgt. Dit veroorzaakt ernstig ongerief voor de dieren. De dieren worden gedurende het experiment meerdere malen geïnfecteerd, waardoor er een gerede kans is op het ontstaan van dergelijke infecties met ernstig ongerief bij dieren die materialen zonder antibacteriële middelen krijgen. De onderzoekers worden verzocht het geschatte percentage dieren dat ernstig ongerief zal ervaren toe te voegen.
- Datum antwoorden: 22-06-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Project Proposal:**
- 3.1-Response: We apologize for the mistake of removal rate of the implants. However, the infection rate of the endo-exo prostheses is still very high based on the literature, e.g. 13%–30% (Aschoff, H.H., 2012; Aschoff, H.H., 2010) and 18%–23% (Hagberg, K.,2009; Tillander J, 2012). Although this infection does not always result in implant loosening, revision and/or even removal of the implant, it still is a major cause of pain, medication, and prolonged hospital time for the patient group (revised in the application). Although Aschoff and Juhnke reported that the prevalence of infections can be reduced by adjusting the shape of the prosthesis in 2012, exit-site infections remain one of the main complications for percutaneous devices (Johannes Großhauser, 2015). The approach we adopt in this study, i.e. using antibacterial patch and sleeve, will also be potentially applicable for the other types of percutaneous devices, such as permanent catheters, orthopaedic fixation devices, drivelines for ventricular assist devices etc.
- 3.4-Response: We fully understand the concern. To make the research strategy more clear, we added a diagram showing the procedures. This procedure diagram has been added to the application form in 3.4.1. The related text has also been changed accordingly.
- 3.4.2. Response: The whole procedure is shown in the figure in the 3.4.1. The number of study is chosen based on the consideration that research may encompass with some risk of failure. We cannot try infinitely, but 5, as a realistic number, is chosen as the limitation for this study. The experiment will be examined sequentially as shown in the diagram.
- 3.4.2-Response: The Kirby-Bauer test is the other name of agar diffusion test, which is the most widely used antibacterial test. In Kirby-Bauer test, the materials will be placed on an agar plate inoculated with relevant bacteria. After 18 to 24 hours, there will be a transparent circle area around the material if the material has an antibacterial effect. The size of the transparent area is correlated to the antibacterial efficacy. In this Kirby-Bauer test, we intend to evaluate whether the materials are still effective after predetermined time of in vivo

experiment. This is important to know, as there is no antibacterial effect after the experiment, then this means that the patches should be replaced more frequently.

- 3.4.2-Response: Response: The biocompatibility of the materials tested in rats is a representation of that in larger animals and humans. As we cannot use rats to perform the procedure described in the test III due to the size of implants, we have to choose larger animals, e.g. rabbits. Besides, this model is constructed by [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]), thus we have previous experience working with this animal model.
- 3.4.2-Response: Response: We prefer a standardized test by using one strain of bacteria. As reported in literature (Tillander, J. 2010; Chou, T.G, 2010; Darouiche, R.O, 2007; Williams, D.2008), the most common bacteria in superficial and deep cultures are Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. Therefore, S. aureus is chosen in this experiment.
- **Description of Animal Procedures:**
- DAP 1, onderdeel B.-Response: The materials is shown in the diagram in 3.4.1. Maximally five studies will be conducted. In each study, the groups will be [REDACTED] [REDACTED]
- DAP 2, onderdeel B. Response: The materials is shown in the diagram in 3.4.1. Maximally five studies will be conducted. In each study, the groups will be [REDACTED] [REDACTED]
- DAP 2, onderdeel A. Response: In this project, we will start to test chitosan based materials for the reason that chitosan and its derivatives have attracted much attention as antimicrobial agents against fungi, bacteria and viruses. As chitosan alone may not fulfil the requirement to be used as patches or sleeves, we will further modify this material to 1) improve the mechanical properties, and 2) achieve a sustained release of drugs. As is reported in many literatures (Tillander, J. 2010; Chou, T.G, 2010; Darouiche, R.O, 2007; Williams, D.2008), the most common bacteria in superficial and deep cultures were Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. Therefore, S. aureus is chosen in this experiment. We will not choose the other bacteria in this study, because multi-bacterial composition is hard to standardize. Although this model is constructed by our group leader, [REDACTED] [REDACTED]), our group has never used this setup (bacteria inoculation) before. But this method has been reported in literature (Hart E., 2010; Park S.U., 2014), where the test materials were similar to our samples. Therefore, we adopt it as a quantification method.
- DAP 3, onderdeel A, tweede vraag. Response: The choice of the stain of bacterial is based on the same reason that we explained in DAP2. Besides, 1×10^8 CFU of S. aureus will be used in this study based on literature (Chou, T.G, 2010; Williams, D.2008). This has been added to the application test. Besides, this model is constructed by our group leader, [REDACTED] [REDACTED] thus we have previous experience working with this animal model, however, we did not incubate bacteria in this model before in our lab. Only one time point (24 weeks) will be included. The text has been changed to make it clear.

- DAP 3, onderdeel B- Response: The conditions of detection has been shown in A1. The infection status will be evaluated using clinical signs, microbiological methods, and histological staining. Clinical signs of infection will be evaluated weekly according to Checkette et al (R. G. Checketts, 2000). Blood and tissue samples around the implants will be analyzed using microbiological methods to confirm the bacteria infection. Tissue samples will also be histologically evaluated by Brown- Brenn modified Gram stain and hematoxylin and eosin (H&E). The Brown- Brenn stain is used to detect the presence of bacteria, and the H&E stain is used for observing inflammation and fibrosis.
The required group size is based on literature, where some groups experienced high failure rates. We choose 18, the highest group size for calculation. However, This number may be changed based on our pilot study in the future. To avoid confusion, we changed the animal number to only mention 18 for now in the application.
- DAP3, onderdeel K. Response: one group of animals receives materials without antibacterial agents. They are likely to reach the humane endpoints. Therefore, the estimated percentage of animals experiencing severe distress is 15% (1/7 group). As the animals will be euthanized at humane-end points, this is not supposed to increase the distress level of the whole study.
-
- Datum: 13-07-2015
- Strekking van de vragen:
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP3, onderdeel B: Welke behandeling ondergaat de sham groep? De onderzoekers worden verzocht dit duidelijker op te schrijven. De onderzoekers willen de antibacteriële effectiviteit van patches en sleeves onderzoeken. Welke onderzoeksvraag willen de onderzoekers beantwoorden met de groepen waarin zowel een patch als sleeve wordt gebruikt maar waarin één van beide zonder medicijn wordt gebruikt (patch + drug and sleeve – drug, patch – drug and sleeve + drug? Verwachten zij dat deze combinaties in de praktijk gebruikt zullen worden? Zij worden verzocht de rationale voor het includeren van deze groepen toe te lichten, of deze groepen te verwijderen uit de aanvraag en het totaal aantal konijnen met 36 te reduceren.
- -DAP3, onderdeel K: De onderzoekers worden verzocht de laatste zin te schrappen (As the animals... the whole study) en aan te geven welk percentage van de konijnen matig ongerief zal ervaren en welk percentage ernstig ongerief. Tevens worden zij verzocht deze informatie te verwerken in de niet-technische samenvatting bij onderdeel 3.5.
- Datum antwoord: 14-07-2015
- Strekking van de antwoorden:
- DAP3, onderdeel B Response: We agree with the comments, and have changed to 5 groups as suggested. The groups now are clearly described in the application form. The scientific question is to explore the long-term antibacterial effect from our materials or drugs, but also where the drug can be best applied (hence the groups). The animal number is reduced by 36, and the related content has been changed accordingly throughout the proposal.
- DAP3, onderdeel K Response : The last sentence was removed as suggested. The expected discomfort level is moderate to severe. The percentage of severe would be maximally 40% (2/5 group) and the percentage of moderate would be 60% (3/5 group). The content in 3.5 has also been changed accordingly.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop an effective strategy to prevent the occurrence of short as well as long term infections of percutaneous implants. The end goal is to provide a safe and cost-efficient treatment when using bone-anchored prostheses.' Prothesen die verankerd zijn in het bot, zogenaamde endo-exoprothesen, hebben veel voordelen voor de patiënt zoals minder irritatie aan de stomp en verbeterde functie van de prothese. Een belangrijk nadeel is de hogere incidentie van infecties doordat de huid niet meer intact is. Dergelijke infecties kunnen leiden tot ongewenste speling in, en uiteindelijk tot het verlies van, de prothese. Een dergelijke infectie kan ook anderszins tot ernstige complicaties leiden. Met betere infectiepreventie is daarom veel gezondheidswinst te behalen voor mensen met endo-exoprothesen. De veiligheid en werkzaamheid van een nieuw ontwikkeld antimicrobieel materiaal op basis van chitosan – al dan niet in combinatie met medicijnen - wordt in dit project uitgetest bij ratten. Voorts wordt duidelijk of manchetten en lapjes van dit materiaal – al dan niet in combinatie met medicijnen - effectief zijn ter preventie van infecties rond prothesen bij konijnen. De te behalen onderzoeksresultaten zullen een indicatie geven van de mogelijke toepassing van dit materiaal bij mensen met een endo-exoprothese. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot effectievere infectiepreventie voor mensen met een endo-exoprothese of andere transdermale producten. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan een betere kwaliteit van leven voor mensen die een ledemaat missen. Hun prothesen zullen beter en met minder complicaties kunnen functioneren, waardoor hun deelname aan het maatschappelijk verkeer zo min mogelijk belemmerd wordt. De commissie acht dat van substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn wetenschappelijk verantwoord en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De betrokken onderzoeksgroepen hebben ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven.

De proeven in de beide diersoorten volgen logisch op elkaar. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de veiligheid en werkzaamheid van een nieuw te ontwikkelen antimicrobieel materiaal op basis van chitosan, en het effect van toevoeging van medicijnen aan dit product. Deze resultaten geven een goede indicatie van de toepassingsmogelijkheid bij mensen met endo-exoprothesen.

5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de ratten wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het subcutaan of in een huidwond aanbrengen van het materiaal, al dan niet in combinatie met een bacteriële infectie, en de pijn en hinder tijdens de genezing van de huid. Het ongerief voor de konijnen wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen van een endo-exoprothese, het aanbrengen van het materiaal in het wondgebied -al dan niet in combinatie met een bacteriële infectie -, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. De DEC schat het ongerief als gevolg van het regelmatig inspecteren van de wonden onder anesthesie en de individuele huisvesting in als licht, het ongerief als gevolg van de benodigde operaties schat de commissie in als matig. Het ongerief als gevolg van botinfecties (optredend bij maximaal 40% van de konijnen) schat de commissie in als ernstig. Het cumulatief ongerief voor de dieren in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd, voor de resterende onderzoeksvragen is onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak met go / no go momenten en het aanbrengen van meerdere subcutane pockets, huiddefecten of endo-exoprothesen per dier, wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 600 ratten en 90 konijnen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De dieren zullen adequate pijnbestrijding ontvangen tijdens en na de operaties. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwachte, ernstige complicaties tijdig kan worden ingegrepen. Het ernstige ongerief als gevolg van de optredende botinfecties in de controle groepen wordt zo kort mogelijk gehouden door het toepassen van een humaan eindpunt. Het ongerief is echter niet geheel te voorkomen, omdat het doel van het onderzoek is aan te tonen dat de te testen materialen dit soort infecties kunnen voorkomen. Verdere verfijning zou het behalen van die doelstelling verijdelen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de vraag welk antimicrobieel materiaal op basis van chitosan voldoende veilig en effectief is om toe te passen bij wondgenezing, al dan niet in combinatie met medicijnen. De resultaten geven een indicatie of deze materialen bij mensen gebruikt kunnen worden ter preventie van infecties van endo-exoprothesen. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van effectievere infectiepreventie voor mensen met een endo-exoprothese of andere transdermale producten. Endo-exoprothesen zorgen voor betere functionaliteit dan traditionele prothesen. Met betere infectiepreventie bij endo-exoprothesen is daarom veel gezondheidswinst te behalen voor mensen die een ledemaat missen. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 100% van de ratten en 60% van de konijnen matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het subcutaan of in een huidwond aanbrengen van het antimicrobiële materiaal of het aanbrengen van een endo-exoprothese. Voor 40% van de konijnen kan het ongerief toenemen tot ernstig als gevolg van botinfecties. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- 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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015241

Bijlagen

2

Datum 25 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015241. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

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: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: researcher
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101 [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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: 10 oktober 2015
Geplande einddatum: 10 april 2019
Titel project: Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses
Titel niet-technische samenvatting: Voorkomen van wondinfecties rond prothesen
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 10 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015241

Bijlagen

2

Datum 25 september 2015
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 25 september 2015
Vervaldatum: 25 oktober 2015
Factuurnummer: 15700241
Ordernummer: 040823-461220 /2015-0072 /

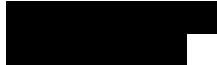
Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015241	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015241

Datum 28 september 2015
Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses met aanvraagnummer AVD103002015241. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 4 november 2015 een beslissing. Omdat een DEC-advies is meegestuurd met de aanvraag, streven wij ernaar om de aanvraag binnen 20 werkdagen te beslissen. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015241

15 OKT 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses" met aanvraagnummer AVD103002015241. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 oktober 2015 tot en met 10 april 2019. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 4 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. De CCD stelt echter enkele algemene voorwaarden.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

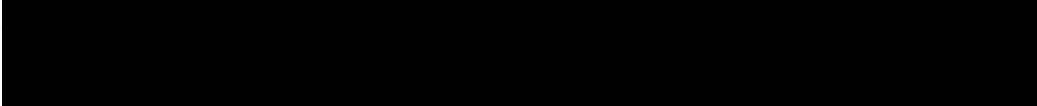
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 oktober 2015 tot en met 10 april 2019, voor het project "Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses" met aanvraagnummer AVD103002015241, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is researcher. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 Een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 september 2015
- 2 De bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 4 september 2015, ontvangen op 10 september 2015.
 - d Uw aanvullingen, zoals ontvangen op 2 oktober 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Subcutaneous test in rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar of Sprague Dawley ratten	480	Matig / moderate	
Wound healing test in rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar of Sprague Dawley ratten	120	Matig / moderate	
Bone-anchored implant antibacterial test in rabbits	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / New Zealand rabbits	90	Ernstig / severe	Maximaal 40% van de dieren ernstig. Overige matig.

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten de goedkeuring van de IvD hebben gekregen.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Voorschriften

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Wegens ernstig ongerief bij een aantal van de konijnen is beoordeling achteraf nodig. De informatie dient uiterlijk 10 april 2020 te worden ingediend bij de CCD.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2019 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van

het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 15 oktober 2015 16:53
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Beslissing projectvergunning dierproeven
Bijlagen: Beslissing projectvergunning dierproeven AVD103002015241.pdf

Geachte [REDACTED]

Op 10 september 2015 hebben wij u aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project: Prevention of infection around skin penetrating limb prostheses met aanvraagnummer AVD103002015241. [Hierbij ontvangt u de beslissing van dit project.](#) De brief wordt per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
[REDACTED]

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015242								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x	x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
11	Reactie aanvulling aanvraag				x		x	x	
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	



15 SEP. 2015

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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9

1.3 Vul de gegevens van het postadres in. *Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

Straat en huisnummer	Geert Grooteplein-zuid 10
Postbus	9101
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
IBAN	NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St. Radboud

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 1 0 _ 1 0 _ 2 0 1 5 |
| Einddatum | 1 0 _ 1 0 _ 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|------------------------------------|
| Tape ter preventie darmnaadlekkage |
|------------------------------------|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| Het gebruik van een tape om operatieve verbindingen tussen darmen af te dichten. |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--------------------------------------|
| Naam DEC | DEC Radboud Universiteit (RUDEC) |
| Postadres | Geert Groteplein 10 6525 GA Nijmegen |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Nijmegen
Datum	10 - 09 - 2015
Handtekening	[REDACTED]



Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Tape ter preventie darmnaadlekkage |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> Higher education or training |
|-----|---|---|

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

Wereldwijd wordt jaarlijks bij meer dan een miljoen patiënten een chirurgische verbinding tussen twee darmdelen aangelegd, een zogenoemde darmnaad (of anastomose). Dit gebeurt onder andere bij operaties in verband met darmkanker, darmziekten (bv. ziekte van Crohn) en morbide obesitas. De meest gevreesde en meest voorkomende complicatie na dergelijke ingrepen is een lekkage van de darmnaad. Zogenoemde naadlekkage komt met een incidentie tussen de 4-15% het vaakst voor bij naden in de dikke darm ([Kang, Halabi et al. 2013](#)). Bij een naadlekkage lekt er darminhoud de buikholte in, wat resulteert in abscessen, buikvliesontsteking of zelfs overlijden ([Frasson, Flor-Lorente et al. 2014](#); [Hammond, Lim et al. 2014](#)). Ook gaat het gepaard met een verminderde kwaliteit van leven en een verhoogde kans op recidieven van darmtumoren ([Branagan and Finnis 2005](#)). Vaak zijn er ingrijpende maatregelen nodig om de lekkage te behandelen. Deze bestaan bijvoorbeeld uit abcespuncties, heroperaties, aanleggen van een stoma en opname op een Intensive Care afdeling. De ernstige gevolgen en hoge incidentie van naadlekkage vragen om onderzoek gericht op het verminderen van deze chirurgische complicatie.

Als strategie om het optreden van naadlekkage te voorkomen wordt er onder andere gedacht aan het gebruik van *sealants*, zoals fibrinelijm en cyanoacrylaatlijm, om de darmnaad af te dichten ([van der Ham, Kort et al. 1992](#); [Stumpf, Junge et al. 2009](#); [Pommergaard, Achiam et al. 2012](#)). Tot nu toe zijn deze *sealants* echter onvoldoende effectief gebleken in het voorkomen van lekkage, en worden derhalve niet toegepast in de kliniek ([Pommergaard, Achiam et al. 2012](#)). Bovendien worden er ook complicaties gezien bij het experimenteel gebruik van lijmen. Hierbij gaat het vooral om het veroorzaken van darmvernauwingen en obstructie, en het ontstaan van abscessen. Een verklaring voor het ontstaan van vernauwingen is dat het littekenweefsel door de lijm contraheert of dusdanig stijf wordt dat de darm onvoldoende uit kan zetten. Ook kan het hard worden van de lijm zelf hierbij een rol spelen. Als lijm hard wordt zou deze bij eventuele uitzetting van de darm bovendien kunnen breken en daardoor niet meer functioneren als afdichting van de naad. Tenslotte kan lijm ook makkelijk tussen de twee darmdelen gaan zitten, waardoor het een barrière vormt die het natuurlijk genezingsproces hindert.

Een alternatieve methode om een darmnaad af te dichten en daarmee mogelijk lekkage te voorkomen, is het gebruik van een flexibele tape. Een voordeel van een dergelijke tape is dat er de door flexibele/elastische eigenschappen mogelijk een kleinere kans op obstructie bestaat. Daarnaast gaat tape, in tegenstelling tot lijm, niet tussen de wondranden van beide darmdelen zitten. Een ander bijkomend voordeel van tape is dat het ook een deel van de naastgelegen darm omvat. Omdat daarmee de mechanische krachten op de anastomose verdeeld worden over het hechtmateriaal

en de tape, ontstaan er mogelijk minder snel defecten van de naad. Mocht er wel een defect ontstaan, dan zou de tape er vervolgens weer voor kunnen zorgen dat dit niet leidt tot fecale verontreiniging van de buikholte of tot een volledige dehiscentie van de naad.

Er is één rattenstudie waarin het gebruik van een tape bij darmnaden onderzocht is (Ayhan, Clin Invest Med 2012). Uit deze studie werd geconcludeerd dat de tape (TissueMed TissuePatch) meer effectief is in het voorkomen van lekkage dan fibrinelijm. Deze tape is inmiddels op de markt als algemeen product zonder specifieke toepassing, maar wordt niet getest of gebruikt voor darmnaden bij mensen. Er is momenteel te weinig vertrouwen in deze toepassing omdat er behoudens de rattenstudie geen ander bewijs is dat de tape effectief is. Uit eigen onderzoek met deze specifieke tape blijkt bovendien dat de tape niet uitrekbaar is en daardoor in theorie een verhoogd risico op darmobstructies zou opleveren.

Inmiddels hebben we in samenwerking met een commercieel bedrijf een nieuwe tape ontwikkeld met veelbelovende fysieke eigenschappen, welke in de rest van deze projectaanvraag aangeduid zal worden als [REDACTED] [REDACTED] is gebaseerd op een geactiveerd polymeer van [REDACTED] met plakkende NHS-groepen, welke onder natte omstandigheden kan kleven aan meerdere soorten weefsels.

Uit *ex vivo* studies met varkensdarm uitgevoerd in ons eigen lab, blijkt de waterdichte tape een goede hechting aan darmwanden te hebben en de sterkte van een *ex vivo* darmanastomose te kunnen vergroten. Op dit moment zijn er nog meerdere prototypes van [REDACTED] met verschillende chemische samenstelling en eigenschappen. Met *ex vivo* testen op darmweefsel worden deze prototypes o.a. getest op plakkracht, sterkte en elasticiteit om het beste prototype te selecteren. Ook worden met behulp van *ex vivo* modellen de optimale afmetingen van de tape bepaald voor het gebruik rondom darmnaden. De volgende stap is onderzoeken of de tape ook in vivo functioneert en in staat is om complicaties te voorkomen.

Samenvattend is het doel van dit project om te onderzoeken [REDACTED], een nieuw ontwikkelde tape voor medisch gebruik, veilig kan worden toegepast rondom darmnaden en daarmee in staat is naden te versterken en naadlekkage te voorkomen. Een eerste proof of principle en bestudering van effectiviteit en veiligheid zal worden gedaan in een rattenmodel; het bepalen van het risico op darmaanspecifieke complicaties en het bepalen van effectiviteit met het oog op translatie naar de mens zal worden gedaan in varkens.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

Het doel van dit project is om een nieuwe tape ([REDACTED]) te onderzoeken op effectiviteit (versteving van darmnaden en preventie van naadlekkage) en veiligheid (vreemd lichaamsreactie en infectie potentiering).

Hoofdvraag:

1. Kan [REDACTED] de frequentie of ernst van naadlekkage verminderen?

Deelvragen:

- 1. Welke weefselreacties veroorzaakt [REDACTED]**
- 2. Kan [REDACTED] veilig worden gebruikt rondom darmnaden en kan het normale naden versterken?**
- 3. Hoe (snel) verloopt het afbraakproces en wat is het risico op langetermijncomplicaties?**
- 4. Wat zijn de gevolgen van het gebruik van [REDACTED] in een gecontamineerde buikholte?**

Haalbaarheid

Binnen onze afdeling is veel ervaring met darmnaadgenezing in dierexperimenten. Het onderzoek naar de genezing van darmnaden is de laatste jaren een van de belangrijkste onderzoeksgebieden geweest van de afdeling [REDACTED] en heeft geleid tot vele publicaties en 10 proefschriften. Er is met name veel ervaring opgedaan met rattenmodellen, maar ook met biomechanische analyses van varkensdarmnaden. Binnen [REDACTED] is bovendien veel ervaring met operaties in varkensmodellen. De darmoperaties zullen worden uitgevoerd door ervaren chirurgen. Daarom achten we de kans op het technisch slagen van de experimenten in dit project groot.

3.3 Relevance

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

Het wetenschappelijke belang van het huidige project omvat het vergroten van de kennis van een nieuw ontwikkeld product en verkennen van de toepassingen ervan. Dit kan leiden tot vele inzichten in het gebruik van dit op [REDACTED] gebaseerd materiaal, met name in de medische wereld. Het meest vooraanstaande belang is het verbeteren van de klinische uitkomst bij darmoperaties, door de kans op lekkage en de daarmee gepaard gaande morbiditeit en mortaliteit te verkleinen. Zowel een verbetering in de zorg van de patiënt en een kostenbesparing door het terugdringen van het aantal complicaties na darmoperaties dienen een maatschappelijk belang.

3.4 Research Strategy

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

1. Proof of principle en basisveiligheid- rat

Allereerst zal in een ratmodel, als *proof of principle*, worden onderzocht of [REDACTED] in de buikholte adequate plakkracht behoudt. Verschillende factoren, zoals langs elkaar bewegende darmen of verklevingen van het omentum (vetschort), zouden de werking van [REDACTED] kunnen verhinderen en verschuiving van de tape kunnen veroorzaken. Daarnaast moet worden onderzocht wat voor weefselreacties er ontstaan. Bij het inbrengen van lichaamsvreemd materiaal kunnen er nadelige afweerreacties optreden. Om de vooraf kans hierop te beperken is [REDACTED] opgebouwd uit verschillende bestanddelen die afzonderlijk ook in andere medische producten worden gebruikt. Het is echter nog onbekend wat het effect is van de combinatie van deze bestanddelen en met name van de plakkende laag.

2. Effectiviteit – rat

Na het onderzoeken van het *proof of principle* en vreemd lichaamsreacties, zullen we een rattenmodel gebruiken om de effectiviteit van [REDACTED] ter versteviging van darmnaden **en de preventie van naadlekkage** te bestuderen. Omdat we veel ervaring hebben met een model voor darmnaadgenezing en naadlekkage in de rat, gebruiken we ook dit model om een inschatting te maken van de effectiviteit van [REDACTED]. **Om de effecten van de tape op de darmnaad te onderzoeken, zal de tape eerste worden onderzocht in een model voor normale darmnaadgenezing, omdat er bij lekkage modellen sprake is van andere versturende factoren, zoals bacteriële contaminatie en heftige ontstekingsreactie. Ook gebruiken we het model voor normale darmnaadgenezing om de verstevigende werking van de tape te bepalen. Om naadlekkage te voorkomen, is het nodig om het ontstaan van zwaktes in de naad te tegen te gaan. Dit hangt nauw samen met een versterking van de naad door afdichting van kleine defecten en ondersteuning van de hechtingen, en kan worden**

onderzocht met barstdruk en treksterkte. Vervolgens zal in een model voor gestoorde naadgenezing worden onderzocht wat de effecten zijn op de incidentie en ernst van naadlekkage.

3. Veiligheid – rat

Vervolgens zullen we in ratten uitgebreider de veiligheid van █████ bestuderen, waarbij we met name kijken afbraaksnelheid en naar vreemd lichaamreacties op langere termijn. Omdat naadlekkage vooral in de eerste twee weken na de operatie voorkomt, is het wenselijk dat de tape niet te snel afbreekt. Echter, omdat langdurige aanwezigheid van lichaamsvreemd materiaal ook nadelig kan zijn (bv. door het veroorzaken van een chronische vreemd lichaamreactie, of erosie door darm), is het beter als de tape uiteindelijk wel wordt afgebroken. █████ is daarom gemaakt van afbreekbare materialen. Door enkele *in vitro* testen verwachten we dat de degradatietermijn van █████ tussen de 1 en 4 maanden ligt, maar er zijn *in vivo* proeven nodig om te bepalen wat de afbraaksnelheid daadwerkelijk is.

Bij het bestuderen van de veiligheid willen we ook kijken wat het is van gebruik van █████ in een gecontamineerde omgeving. Bij darmchirurgie kan er sprake zijn van (ernstige) bacteriële contaminatie van de buikholte. Het is bekend dat de aanwezigheid van lichaamsvreemd materiaal de afweerreactie van het lichaam kan verhinderen, onder andere doordat afweercellen het materiaal niet goed kunnen penetreren. Daarom zullen we in een peritonitismodel onderzoeken wat de gevolgen zijn van gebruik van █████ in infectieuze situaties.

4. Veiligheid en Effectiviteit - varken

Voor het bepalen van de translatie naar de mens zullen we een varkensmodel gebruiken. Een belangrijke complicatie die in theorie zou kunnen optreden is een obstruerende vernauwing van de darm. Omdat de diameter van de darm hierbij zeer relevant is en we een reële inschatting willen maken van het risico bij gebruik in mensen, maken we hiervoor gebruik van een varkensmodel met een normale darmnaad. Daarnaast zullen we voor het bepalen van de effectiviteit van █████ ter preventie van lekkage van grotere darmnaden ook in varkens een model gebruiken waarbij lekkage geïnduceerd wordt door het compromitteren van de naadgenezing.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

1. Proof of principle en basisveiligheid- rat

Met een model voor darmnaadgenezing in de rat zullen we in dit onderdeel van het project:

- bepalen of █████ zijn plakkracht en positie behoudt bij *in vivo* gebruik rond darmnaden.
- bepalen hoe het lichaam, en met name de buikorganen en de darm, reageren op de tape. Hierbij zullen we o.a. kijken naar het optreden van ontstekingsreacties, abcesvorming, verklevingen.

2. Effectiviteit - rat

Met een model voor darmnaadgenezing en naadlekkage in de rat zullen we in dit onderdeel van het project onderzoeken of darmnaden kunnen worden versterkt door █████, en of naadlekkage kan worden voorkomen.

3. Veiligheid - rat

In dit onderdeel zal de veiligheid van het gebruik van █████ verder worden onderzocht. Hiervoor zal er bij de dieren een laparotomie verricht worden waarbij █████ op meerdere plaatsen in de buikholte wordt aangebracht. Er zal worden gekeken naar de afbraaksnelheid en het optreden van vreemd

lichaamreacties op de langere termijn. Ook zal worden onderzocht wat er gebeurt bij het gebruik van █████ als er sprake is van bacteriële contaminatie. Er zal zowel worden gekeken naar het verloop van infecties, als naar het functioneren van de tape.

4. Veiligheid en Effectiviteit – varken

Met het oog op de toepassing bij mensen zal de effectiviteit en veiligheid van █████ in dit onderdeel worden onderzocht in varkens. Eerst zal met een model voor normale naadgenezing het optreden van complicaties op de korte termijn worden onderzocht. Vervolgens zal met een varkensmodel voor gestoorde naadgenezing worden onderzocht of de tape in staat is naadlekkage te voorkomen of de ernst ervan te verminderen. Tenslotte zal worden onderzocht wat de lange termijn (6 maanden) effecten zijn van het gebruik van █████ rondom darmnaden, waarbij met name wordt gekeken naar de kans op vernauwingen.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

Als uit de experimenten in onderdeel 1 blijkt dat de plakkracht van de tape op de darm adequaat is en er geen grote complicaties (zoals forse ontstekingsreacties of abcesvorming) optreden, dan zullen we verder gaan met onderdeel 2.

Als uit onderdeel 2 blijkt dat █████ de potentie heeft om darmnaden te versterken, zullen we verder gaan met onderdeel 3 en 4. De lange termijn experimenten in onderdeel 4 zullen pas worden gestart nadat de lange termijn effecten in onderdeel 3 zijn onderzocht, en ook de korte termijn experimenten in onderdeel 4 zijn afgerond.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	3.4.4.1 Proof of principle - rat
2	3.4.4.2 Effectiviteit - rat
3	3.4.4.3 Veiligheid - rat
4	3.4.4.4 Veiligheid en effectiviteit - varken

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure 3.4.4.1 Proof of principle - rat

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

De doelen van dit onderdeel zijn:

1. bepalen of [redacted] zijn plakkracht en positie behoudt bij *in vivo* gebruik rond darmnaden (proof of principle)
2. bepalen hoe het lichaam, en met name de buikorganen en de darm, reageren op de tape. Hierbij zullen we o.a. kijken naar het optreden van ontstekingsreacties, abcesvorming, verklevingen (basisveiligheid)

We zullen hiervoor gebruik maken van een model voor darmnaadgenezing in mannelijke [redacted] ratten. Dit is een model waar onze afdeling zeer veel ervaring mee heeft en dat geschikt is gebleken voor het bestuderen van basale mechanismen van darmnaadgenezing en interactie met lichaamsvreemd materiaal. Bovendien heeft [redacted] een systematisch review verricht waaruit blijkt dat de rat ook wereldwijd verreweg het meest gebruikte dier is voor het bestuderen van darmnaden ([redacted]). De rat is voor ons het meest praktische dier om de algemene eigenschappen van [redacted] *in vivo* te bestuderen. De technieken die we gebruiken zullen hetzelfde zijn als bij eerdere projecten, zodat de resultaten goed geïnterpreteerd en vergeleken kunnen worden.

De primaire uitkomst die we in dit onderdeel gebruiken voor het functioneren van de tape is de positie van de tape rondom de naad bij opoffering van de rat. Er wordt gekeken of de tape nog strak om de naad zit of dat er sprake is van loslating of zelfs migratie naar andere delen van de buikholte.

Belangrijke secundaire uitkomstmaten zijn het optreden van ontstekingsreacties, verklevingen aan andere buikorganen, darmvernauwingen, inkapseling van de tape. Ook zullen de stukken darm met tape worden verzameld voor histologische analyses om weefselreacties te onderzoeken.

Geplande onderzoeksopzet en groepen:

Groep 1a: darmnaad ileum + [redacted], opofferen dag 1

Groep 1b: darmnaad ileum + [redacted], opofferen dag 3

Groep 1c: darmnaad ileum + [redacted], opofferen dag 7

Groep 2a: darmnaad **proximale** colon + [redacted], opofferen dag 1

Groep 2b: darmnaad **proximale** colon + [redacted], opofferen dag 3

Groep 2c: darmnaad **proximale** colon + [redacted], opofferen dag 7

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

Interventies

Voor alle dieren geldt dat onder algehele narcose met isofluraan een laparotomie wordt verricht waarbij er een darmnaad zal worden aangelegd. De controlegroepen uitgezonderd zal [REDACTED] vervolgens om de darmnaad worden aangebracht. Tevens zullen er enkele variaties worden toegepast om de relevantie hiervan op het functioneren van [REDACTED] te onderzoeken. De darmnaden zullen worden aangelegd op verschillende plaatsen in de darm (ileum, of **proximale colon**), **om te bepalen of de verschillen tussen deze delen (andere darmwand, andere diameter, andere fecale consistentie) invloed hebben op de werking van de tape. Door verschillen in fecale consistentie en uitrekking van de darm kan de tape mogelijk eerder loslaten of eerder obstructie veroorzaken. Bovendien worden het ileum en het proximale colon in dit *proof of principle* onderdeel gebruikt om te testen of beide darmdelen ook geschikt zijn om de toepassing van de tape verder te onderzoeken, zoals gepland in onderdeel 3.4.4.2.**

Duur van experimenten

Voor het *proof of principle* zal de werking van de tape op korte termijn worden onderzocht. De dieren zullen in de eerste week na de operatie op verschillende tijdstippen worden opgeofferd zodat we de werking van de tape en de reactie van het lichaam over de tijd kunnen bestuderen. Dag 3 is relevant voor het bestuderen van de darmnaad omdat de naad op deze dag op zijn zwakst is. Dag 7 is relevant om dat lekkage vooral in de eerste week voorkomt en het daarom gewenst is dat de tape gedurende deze periode functioneert.

Voortgang naar onderdeel 3.4.4.2

Als uit de experimenten in onderdeel 1 blijkt dat de plakkracht van de tape op de darm adequaat is en er geen ernstige complicaties (zoals forse ontstekingsreacties of abcesvorming) optreden, dan zullen we verder gaan met onderdeel 3.4.4.2.

Mochten er wel dergelijke tegenvallende uitkomsten worden gezien, dan zal er worden gezocht naar de oorzaak, en zullen de *proof of principle* experimenten mogelijk worden herhaald, met gebruik van andere technieken of eventueel een ander prototype tape.

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

Omdat de generieke werking van de [REDACTED] in dit onderdeel wordt gescreend, dient het tevens als pilot voor de rest van het project. Mochten er onverwachte complicaties of tegenvallende prestaties worden gezien, dan bespaart dit het gebruik van dieren in het volgende onderdeel. Daarnaast zal er per experiment een weloverwogen berekening of beredenering worden gedaan voor het bepalen van de groepsgrootte (zie sectie 2B.).

B. The animals

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

Soort: Rat
Ras: Wu [REDACTED]
Geslacht: Mannelijk
Leeftijd: 2-3 maanden / tussen 230 en 280 gram
Herkomst: [REDACTED]

Geschatte aantallen:

Omdat dit onderdeel van het project een zeer exploratief karakter heeft, is het aantal benodigde groepen en dieren nog onzeker. Het aantal opoffermomenten, en dus het aantal groepen, zal afhangen van de eerste experimenten. Bijvoorbeeld, als we zien dat de tape na 24 uur niet meer functioneert zal er niet worden gekeken na 7 dagen. Vervolgens zullen de benodigde aantallen per groep weer afhangen van de hoeveelheid complicaties die we zien. Zoals aangegeven in sectie 2A zullen we voor het bepalen van de uiteindelijke aantallen zoveel mogelijk gebruik maken van statistische methodes.

Vanwege het verkennende karakter van dit onderdeel kan er ook sprake zijn van onvoorziene omstandigheden. Door de aanwezigheid van verklevingen kan de inspectie bij opofferen, of het verkrijgen van samples voor histologische coupes, bemoeilijkt worden. Ook kan de tape sneller degraderen dan verwacht. Daarnaast kan het bij tegenvallende resultaten nodig zijn het experiment te herhalen met een aangepast prototype. Daarom hebben we het geschatte benodigde aantal dieren hierop aangepast, zoals is aangegeven in tabel 1.

Dierproef 3.4.4.1	Geschatte aantal groepen	Gemiddelde n per groep	Geschatte aantallen
Proof of principle; uitkomsten <1 week	6	10	60
Eventuele uitbreiding/herhaling om technische of inhoudelijke redenen			60
Totaal			120

Tabel 1

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat	██████	120	2-3 maanden

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Vervanging& vermindering

In de ontwikkelingsfase van ██████ is gebruikt gemaakt van *ex vivo* experimenten (o.a. op varkensdarm uit het slachthuis) om de effectiviteit van verschillende prototypen te onderzoeken. Door daarbij de *in vivo* situatie te simuleren (o.a. met behulp van warmtebaden en peristaltische bewegingen) kon het gebruik van dierproeven voor het betreffende onderzoek vermeden worden.

Omdat het algemeen functioneren van ██████ in dit onderdeel wordt gescreend, dient het tevens als pilot voor de rest van het project. Mochten er onverwachte complicaties of tegenvallende prestaties worden gezien, dan bespaart dit het gebruik van varkens in het volgende onderdeel.

Verfijning

Door ons te houden aan de verschillende onderzoeks- en publicatierichtlijnen (ARRIVE, FELASA, SYRCLE's gold publication standard) streven we naar een zo hoog mogelijke kwaliteit van onze experimenten. Daarbij maken we gebruik van maatregelen om de kans op bias te verminderen

(randomisatie, blinding) en doen we de operaties met aseptische technieken om de kans op infectieuze complicaties van buitenaf te verminderen. Tenslotte proberen we het dierenleed zoveel mogelijk te beperken door adequate verzorging. De dieren worden gehuisvest volgens vigerende protocollen. Ze zullen na de operatie gedurende 48 uur pijnstilling krijgen om de kans op pijn als gevolg van de operatie te beperken. Ook zullen de dieren aan het eind van de operatie extra vocht toegediend krijgen om uitdroging te voorkomen. Daarnaast zullen de dieren dagelijks geïnspecteerd worden op tekenen van lijden. Humane eindpunten worden bepaald om de kans op inhumain lijden te minimaliseren (zie sectie J. Humane eindpunten).

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

Verwerkt in antwoord onder D.1.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

■ is een nieuw ontwikkeld product en derhalve niet eerder onderzocht. Er is een review gedaan naar zogenoemde tissue-adhesives, waaruit eveneens is gebleken dat er nog geen vergelijkbaar product is onderzocht.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Voor (gas)anesthesie wordt gebruik gemaakt van isofluraan

Voor analgesie wordt gebruik gemaakt van Buprenorphine

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Na een buikoperatie is er altijd sprake van een herstelperiode van ongeveer 2 dagen. In deze periode kunnen de dieren last hebben van buikpijn, verminderde eetlust en vermoeidheid. Om dit te beperken wordt er tot 48 uur na de operatie pijnstilling gegeven. Indien nodig wordt het voedsel in de kooi gelegd en worden er drinkflessen met lange tuiten geplaatst om het eten en drinken te vergemakkelijken.

Bij het aanleggen van een darmnaad bestaat er een kans op lekkage van de naad. Bij ratten is deze kans klein (<10%). Mocht er lekkage optreden, dan zijn de gevolgen bij normale naden meestal beperkt. Het gaat vaak gepaard met minimale abcessen en verklevingen waar de dieren weinig last van lijken te hebben. In een enkel geval kan er sprake zijn van pusvorming rond de naad, darmobstructie of gegeneraliseerde peritonitis, waar de ratten erg ziek van kunnen worden. Alle dieren worden elke dag geobserveerd. Indien de klinische conditie hiertoe aanleiding geeft, zullen die dieren vaker worden geobserveerd en, om onnodig lijden te voorkomen, tijdig uit het experiment worden gehaald als een humaan eindpunt wordt bereikt (zie sectie J.).

Explain why these effects may emerge.

Verwerkt in antwoord onder I.1.

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

Verwerkt in antwoord onder I.1

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Het humane eindpunt wordt bereikt in het geval van een sterk verslechterde conditie of verdenking op peritonitis, af te meten aan uiterlijke kenmerken zoals sterk verminderde activiteit, lichaamstemperatuur, bolle rug, opstaande haren en brilogen, ingevallen of juist bolle buik. Het kan zijn dat de dieren enkele dagen last hebben van diarree. Dit is helaas inherent aan de ingreep en beschouwen wij op zichzelf niet als een humaan eindpunt. Ook bij een gewichtsverlies van meer dan 20% ten opzichte van het startgewicht, of een verlies van meer dan 15% binnen 2 dagen, wordt het humane eindpunt bereikt.

Indicate the likely incidence.

De kans op complicaties na een laparotomie bij de rat is zeer klein. Ook schatten we de kans op complicaties door het aanbrengen van █████ in als zeer beperkt. Derhalve verwachten we dat het percentage dieren dat het humane eindpunt haalt kleiner is dan 5%.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

Matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Voor alle experimenten in dit project is het nodig om aan het eind van de proef de buikholte te inspecteren op de toestand van de tape en de buikorganen. Hiervoor moeten de dieren opnieuw geopereerd worden. Daarnaast hebben we zowel het bloed als de darmen van de ratten nodig voor aanvullende analyses. Daarom zullen de dieren aan het eind van het experiment worden opgeofferd.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure 3.4.4.2 Effectiviteit - rat

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Het doel van dit onderdeel is:

- onderzoeken of de incidentie of ernst van darmnaadlekkage door █████ kan worden verminderd.

Een subdoelstelling van dit onderdeel is:

- onderzoeken of darmnaden kunnen worden versterkt door █████

We zullen hiervoor gebruik maken van een model voor darmnaadgenezing in mannelijke █████ ratten. Dit is een model waar onze afdeling zeer veel ervaring mee heeft en dat geschikt is gebleken voor het bestuderen van basale mechanismen van darmnaadgenezing en interactie met lichaamsvreemd materiaal. Bovendien heeft █████ een systematisch review verricht waaruit blijkt dat de rat ook wereldwijd verreweg het meest gebruikte dier is voor het bestuderen van darmnaden (█████). De rat is voor ons het meest praktische dier om de algemene eigenschappen van █████ *in vivo* te bestuderen. De technieken die we gebruiken zullen hetzelfde zijn als bij eerdere experimenten, zodat de resultaten goed geïnterpreteerd en vergeleken kunnen worden.

De belangrijkste uitkomsten die we in dit onderdeel gebruiken zijn:

- het optreden van naadlekkage, wat macroscopisch wordt vastgesteld middels laparotomie bij opofferenen

- de ernst van lekkage. Idem, maar dan wordt het beeld ingedeeld volgens een score waarbij wordt gelet op de aanwezigheid van verklevingen, abcessen, pus, peritonitis.

- de sterkte van de naad (Barstdruk, gemeten door de naad uit te nemen en in te spuiten met een vloeistof via een systeem dat aangesloten is op een drukkometer. De druk bij het barsten van de naad wordt genoteerd als barstdruk. Vervolgens wordt de naad uit elkaar getrokken met een tensiometer, waarbij wordt gemeten hoe sterk de capaciteit van het weefsel is om de hechtingen vast te houden.)

Secundaire uitkomstmaten zijn het optreden van ontstekingsreacties, verklevingen aan andere buikorganen, darmvernauwingen en inkapseling van de tape. Ook zullen de stukken darm met tape worden verzameld voor histologische analyses om weefselreacties te onderzoeken.

Geplande experimentele opzet/groepen (**a/b = zonder/met █████ ; D3/D7 = opoffering dag 3 of dag 7**):

Effectiviteit normale darmnaad:

Groepen **1aD3/1bD3**: ileumnaad **zonder/met █████ opoffering dag 3**

Groepen **2aD3/2bD3/2aD7/2bD7**: proximale colonnaad **zonder/met █████ opoffering dag 3 of 7**

Groepen **3aD3/3bD3**: distale colonnaad **zonder/met █████ opoffering dag 3**

Effectiviteit gecompromitteerde naad:

Groepen **4aD3/4bD3**: ileumnaad + diclofenac, **zonder/met █████ , opoffering dag 3**

Groepen **5aD3/5bD3/5aD7/5bD7**: proximale colonnaad + diclofenac, **zonder/met** [REDACTED] **opoffering dag 3 of 7**
Groepen **6aD3/6bD3/6bD7/6aD7**: darmnaad met minder hechtingen, **zonder/met** [REDACTED] **opoffering dag 3 of 7**

Om de effecten van de tape op de darmwand en buikorganen te onderzoeken, zal de tape eerste worden onderzocht in een model voor normale darmnaadgenezing. We gebruiken het model voor normale darmnaadgenezing om de verstevigende werking van de tape te bepalen en hoe dit proces verloopt qua functie en qua pathofysiologie. Om naadlekkage te voorkomen, is het nodig om het ontstaan van zwaktes in de naad te tegen te gaan. Dit hangt nauw samen met een versterking van de naad door afdichting van kleine defecten en ondersteuning van de hechtingen, en kan worden onderzocht met barstdruk en treksterkte. Als we ontdekken dat er versteviging optreedt, is dit belangrijke informatie voor de naadlekkage modellen met de verwachting dat versteviging bij normale darmnaad ook versteviging geeft bij 'dreigend' lekkende naden. Ook kan versteviging van normale darmnaden nadelige gevolgen hebben zoals littekenreactie met obstructie en stricturering. Dit nadelige effect is beter te meten bij normale darmnaden dan bij lekkende darmnaden omdat lekkage en bacteriële contaminatie hun eigen dynamiek hebben m.b.t. het ontstekingsproces en genezingsproces met littekenvorming.

De darmnaden zullen worden aangelegd op verschillende plaatsen in de darm (ileum, of proximale colon en distale colon), om te bepalen of de verschillen tussen deze delen (andere darmwand, andere diameter en andere fecale consistentie) invloed hebben op de werking van de tape. Er bestaat bijvoorbeeld een mogelijkheid dat de harde keutels in het distale colon eerder vast komen te zitten, of dat deze de darm en tape juist dusdanig uitzetten waardoor de tape loslaat van de naad.

Vervolgens zal in een model voor gestoorde naadgenezing worden onderzocht wat de effecten zijn op de incidentie en ernst van naadlekkage. Ook hier zullen verschillende darmdelen worden gebruikt. De vloeibare darminhoud in het ileum lekt mogelijk makkelijker langst te tape dan de (relatief) vastere darminhoud in het proximale colon. (Omdat er geen geschikt model is voor lekkage van distale colonnaden, wordt dit segment niet gebruikt in het deel voor gecompromitteerde naadgenezing). In groepen 4 en 5 zal de genezing gestoord worden door diclofenac toediening, omdat we hiervan weten dat er een consequente hoeveelheid lekkage optreedt en omdat de pathogenese (i.e. 'geleidelijke' verstoring wondgenezing) relevant is in de klinische situatie. In de '6' groepen wordt de darmnaad gecompromitteerd door het verminderen van het aantal hechtingen. Het primaire doel hiervan is niet om lekkage te induceren, maar om te onderzoeken wat de ondersteunende werking van de tape ten opzichte van hechtingen is, en om te bestuderen of de tape ook de capaciteit heeft om grotere defecten af te dichten. Dit zal worden bepaald met barstdrukproeven en dient tevens ter voorbereiding van dierproef 3.4.4.3 waarin bij varkens grotere darmnaad defecten worden aangebracht. In de normale klinische situatie is er initieel geen sprake van grote defecten, maar kunnen deze wel secundair ontstaan als gevolg van genezingsstoornissen. Het darmsegment dat gebruikt zal worden voor de '6' groepen zal nog bepaald worden en zal o.a. afhangen van de resultaten van groepen 4 en 5.

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

Interventies

Voor alle dieren geldt dat onder algehele narcose met isofluraan een laparotomie wordt verricht waarbij er een darmnaad zal worden aangelegd met 8 hechtingen. De controlegroepen uitgezonderd zal ██████ vervolgens om de darmnaad worden aangebracht. In **de groepen met gestoorde naadgenezing** zal de genezing worden gecompromitteerd door het toedienen van NSAIDs (diclofenac intramusculair), of het gebruik van minder hechtingen (0, 2 of 4 hechtingen). Daarmee kan de aanvullende waarde van de tape, ten opzichte van hechtingen alleen, voor de sterkte van de darmnaad worden onderzocht.

Duur van experimenten

In dit onderdeel zal de effectiviteit van de tape op korte termijn worden onderzocht. De dieren zullen in de eerste week na de operatie op verschillende tijdstippen worden opgeofferd zodat we de werking van de tape en de reactie van het lichaam over de tijd kunnen bestuderen. Dag 3 is relevant voor het bestuderen van de darmnaad omdat de naad op deze dag op zijn zwakst is. Dag 7 is relevant om dat lekkage vooral in de eerste week voorkomt en het daarom gewenst is dat de tape gedurende deze periode ook blijft functioneren. **Dag 7 zal worden bestudeerd in de proximale colongroepen omdat de gevolgen van lekkage in het proximale colon minder ernstig zijn dan in het ileum. In de 'gestoorde naadgenezing' groepen zullen de dag 7 groepen (5aD7/5bD7) alleen worden gedaan als op dag 3 al een verbetering blijkt.**

Voortgang naar onderdeel 3.4.4.3 en 3.4.4.4

Als uit de experimenten in dit onderdeel blijkt dat tape de potentie heeft om darmnaden te versterken en lekkage te voorkomen of verminderen, dan zullen we verder gaan met onderdelen 3.4.4.3 en 3.4.4.4.

Mochten er wel dergelijke tegenvallende uitkomsten worden gezien, dan zal er worden gezocht naar de oorzaak, en zullen sommige experimenten mogelijk worden herhaald, met gebruik van andere technieken (bv. tape met afmetingen) of eventueel een ander prototype tape.

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

Mocht uit dit onderdeel onvoldoende effectiviteit van ██████ blijken dan zal er niet aan de volgende serie begonnen worden. Pas als een ander prototype wel werkt zal het project verder gaan.

Daarnaast zal er per experiment een weloverwogen berekening of beredenering worden gedaan voor het bepalen van de groepsgrootte. Hierbij zullen we gebruik maken van onze ruime hoeveelheid aan data voor het inschatten van de uitkomsten van de controlegroepen. Omdat we met name proportionele uitkomstmaten gebruiken (lekkage), maken we gebruik van de sample size calculator op <http://www.select-statistics.co.uk/sample-size-calculator-two-proportions> . Voor experimenten met continue uitkomsten (barstdruk) maken we gebruik van <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html> .

B. The animals

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

Soort: Rat
Ras: Wu ()
Geslacht: Mannelijk
Leeftijd: 2-3 maanden / tussen 230 en 280 gram
Herkomst: ()

Geschatte aantallen:

Het aantal benodigde groepen en dieren in dit onderdeel zal gedeeltelijk afhangen van de uitkomsten van onderdeel 3.4.4.1. Afhankelijk van de uitkomsten/complicaties die daar gezien worden, kan het bijvoorbeeld zijn dat er meer dieren per groep nodig zijn. Zoals aangegeven in sectie 2A zullen we voor het bepalen van de uiteindelijke aantallen zoveel mogelijk gebruik maken van statistische methodes. Bij eerdere experimenten naar naadlekage was de benodigde groepsgrootte gemiddeld 15 (12-18) ratten per groep. Daarom hebben we dit aantal ook gebruikt als schatting voor het benodigde aantal dieren in de lekkagegroepen.

Vanwege het experimentele karakter van dit onderdeel kan er ook sprake zijn van onvoorziene omstandigheden. Daarnaast kan het bij tegenvallende resultaten nodig zijn het experiment te herhalen met een aangepast prototype. Daarom hebben we het geschatte benodigde aantal dieren hierop aangepast, zoals is aangegeven in tabel 1.

Tabel 1 – Geschatte aantal dieren

Dierproef 3.4.4.2	Geschatte aantal groepen	Gemiddelde n per groep	Geschatte aantallen
Effectiviteit normale darmnaad	8	15	120
Effectiviteit gecompromitteerde naad	10	15	150
Eventuele uitbreiding/herhaling			60
Totaal			330

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat		330	2-3 maanden

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Vervanging& vermindering

In de ontwikkelingsfase van █████ is gebruikt gemaakt van *ex vivo* experimenten om de effectiviteit van verschillende prototypen te onderzoeken. Door daarbij de *in vivo* situatie te simuleren (o.a. met behulp van warmtebaden en peristaltische bewegingen) kon het gebruik van dierproeven voor het betreffende onderzoek vermeden worden. Met *ex vivo* experimenten met rattendarm werd gezocht naar de optimale afmetingen van de tape voor rattendarm, en werden de technieken voor het aanbrengen geoefend.

Dit onderdeel dient tevens als beslismoment voor de rest van het project. Mochten er onverwachte complicaties of tegenvallende prestaties worden gezien, dan bespaart dit het gebruik van ratten en varkens in volgende onderdelen.

Verfijning

Door ons te houden aan de verschillende onderzoeks- en publicatierichtlijnen (ARRIVE, FELASA, SYRCLE's gold publication standard) streven we naar een zo hoog mogelijke kwaliteit van onze experimenten. Daarbij maken we gebruik van maatregelen om de kans op bias te verminderen (randomisatie, blinding) en doen we de operaties met aseptische technieken om de kans op infectieuze complicaties van buitenaf te verminderen. Tenslotte proberen we het dierenleed zoveel mogelijk te beperken door adequate verzorging. De dieren worden gehuisvest volgens vigerende protocollen. Ze zullen na de operatie gedurende 48 uur pijnstilling krijgen om de kans op pijn als gevolg van de operatie te beperken. Ook zullen de dieren aan het eind van de operatie extra vocht toegediend krijgen om uitdroging te voorkomen. Daarnaast zullen de dieren dagelijks geïnspecteerd worden op tekenen van lijden. Humane eindpunten worden bepaald om de kans op inhumane lijden te minimaliseren (zie sectie J. Humane eindpunten).

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

Verwerkt in antwoord D.1.

Repetition and Duplication

E. Repetition

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

■■■■ is een nieuw ontwikkeld product en derhalve niet eerder onderzocht. Er is een review gedaan naar zogenoemde tissue-adhesives, waaruit eveneens is gebleken dat er nog geen vergelijkbaar product is onderzocht.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Voor (gas)anesthesie wordt gebruik gemaakt van isofluraan

Voor analgesie wordt gebruik gemaakt van Buprenorphine

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Na een buikoperatie is er altijd sprake van een herstelperiode van ongeveer 2 dagen. In deze periode kunnen de dieren last hebben van buikpijn, verminderde eetlust en vermoeidheid. Om dit te beperken wordt er tot 48 uur na de operatie pijnstilling gegeven. Indien nodig wordt het voedsel in de kooi gelegd en worden er drinkflessen met lange tuiten geplaatst om het eten en drinken te vergemakkelijken.

Bij het aanleggen van een darmnaad is er een kans op lekkage van de naad. In de normale darmnaden bij de rat is deze kans klein <10%. In de experimenten waarbij de naadgenezing wordt gecompromitteerd door toediening van NSAIDs, is deze kans 70-100%. In de meeste gevallen gaat dit gepaard met kleine abscessen of pusvorming rond de naad, waarvan wordt ingeschat dat de dieren er weinig klachten van hebben. In een deel van de gevallen gaat het gepaard met darmobstructie of gegeneraliseerde peritonitis waar de ratten erg ziek van kunnen worden. Alle dieren worden elke dag geobserveerd. Indien de klinische conditie hiertoe aanleiding geeft, zullen die dieren vaker worden geobserveerd en, om onnodig lijden te voorkomen, tijdig uit het experiment worden gehaald als een humaan eindpunt wordt bereikt (zie sectie J.).

Explain why these effects may emerge.

Verwerkt in sectie I.1.

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

Verwerkt in sectie I.1.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Het humane eindpunt wordt bereikt in het geval van een sterk verslechterde conditie of verdenking op peritonitis, af te meten aan uiterlijke kenmerken zoals sterk verminderde activiteit, lichaamstemperatuur, bolle rug, opstaande haren en brilogen, ingevallen of juist bolle buik. Het kan zijn dat de dieren enkele dagen last hebben van diarree. Het kan zijn dat de dieren enkele dagen last hebben van diarree. Dit is helaas inherent aan de ingreep en beschouwen wij op zichzelf niet als een humaan eindpunt. Ook bij een gewichtsverlies van meer dan 20% ten opzichte van het startgewicht, of een verlies van meer dan 15% binnen 2 dagen, wordt het humane eindpunt bereikt.

Indicate the likely incidence.

De kans op complicaties na een laparotomie bij de rat is zeer klein. Ook schatten we de kans op complicaties door het aanbrengen van █████ in als zeer beperkt. Rekening houdend met het optreden van naadlekkage en mogelijke gevolgen hiervan, verwachten we op basis van eerdere projecten dat het percentage dieren dat het humane eindpunt haalt kleiner is dan **10%**. **(Over alle experimenten van de afgelopen 2 jaar met het darmnaadmodel in de rat, was het percentage dieren dat het humane eindpunt heeft behaald lager dan 5 procent. Omdat het percentage in sommige groepen met gestoorde naadgenezing tussen de 6 en 7 procent is geweest en dit percentage kan variëren, hebben we het geschatte percentage voor deze aanvraag naar boven aangepast, namelijk naar 10%.)**

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

We schatten het ongerief voor de dieren in de groepen met normale naadgenezing (**44%**) in als Matig. In de groepen met verhoogde kans op naadlekkage schatten we het ongerief voor de meeste dieren (**46% van totaal**) ook in op Matig. Omdat we de dieren minimaal 1 keer per dag, maar meestal 2 keer per dag observeren, en we ze bij tekenen van verslechterde conditie (bereiken Humane eindpunt) meteen uit het experiment halen, is het ongerief als gevolg van een eventuele naadlekkage van korte duur. **Bij een minderheid (10% van totaal) kan de lekkage ernstig verlopen zonder dat dit tijdig wordt opgemerkt door de onderzoeker waardoor het dier overlijdt, en daarom schatten we het ongerief voor dit percentage in als Ernstig. Hierbij gaan we uit**

van het negatieve scenario waarin de tape niet in staat is de lekkage te verminderen. Als dit wel het geval is zal het percentage ernstig ongerief lager liggen.

Wij baseren onze schatting op de literatuur en de meer recente onderzoeksresultaten van de afgelopen 2 jaar (4 experimenten). Uit onze resultaten blijkt dat er volgens de huidige definitie een Ernstig ongerief was bij 12% in de ileum groepen en bij 0% in de proximale colon groepen. Dus voor het huidige project zou dat neerkomen op een gemiddelde van 2-3% in de lekkagegroepen, en dus in 1% van de totale dierproef. Uitgaande van eventuele variatie en onvoorziene omstandigheden houden we in deze proef rekening met een percentage van 10%.

Om de effectiviteit van de tape ter preventie van naadlekkage te onderzoeken is het nodig om een naadlekkage model te gebruiken. Daarbij is de kans op ernstig lijden als gevolg van een naadlekkage onvermijdelijk. Met de diverse maatregelen beschreven in deze aanvraag (pijnstilling, frequente controles, humane eindpunten, beginnen met modellen voor normale naadgenezing) proberen we de kans op ernstig ongerief zo laag mogelijk te houden.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Voor alle experimenten in dit project is het nodig om aan het eind van de proef de buikholte te inspecteren op de toestand van de tape en de buikorganen. Hiervoor moeten de dieren opnieuw geopereerd worden. Daarnaast hebben we zowel het bloed als de darmen van de ratten nodig voor aanvullende analyses. Daarom zullen de dieren aan het eind van het experiment worden opgeofferd.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300		
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen		
1.3 List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><tr><td data-bbox="604 837 1344 1037">Serial number 3</td><td data-bbox="1344 837 2083 1037">Type of animal procedure 3.4.4.3 Veiligheid - rat</td></tr></table>	Serial number 3	Type of animal procedure 3.4.4.3 Veiligheid - rat
Serial number 3	Type of animal procedure 3.4.4.3 Veiligheid - rat		

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

De doelen van dit onderdeel zijn:

1. bepalen van vreemd lichaamsreacties op de lange termijn
2. bepalen van afbraaksnelheid en afbraakreacties
3. bepalen van veiligheid in gecontamineerde situaties

We zullen hiervoor gebruik maken van een model voor darmnaadgenezing in mannelijke Wistar ratten. Dit is een model waar onze afdeling zeer veel ervaring mee heeft en wat geschikt is gebleken voor het bestuderen van basale mechanismen van darmnaadgenezing en interactie met lichaamsvreemd materiaal. Bovendien heeft [REDACTED] een systematisch review verricht waaruit blijkt dat de rat ook wereldwijd verreweg het meest gebruikte dier is voor het bestuderen van darmnaden [REDACTED]). De rat is voor ons het meest praktische dier om de algemene eigenschappen van [REDACTED] *in vivo* te bestuderen. De technieken die we gebruiken zullen hetzelfde zijn als bij eerdere experimenten, zodat de resultaten goed geïnterpreteerd en vergeleken kunnen worden.

De belangrijkste uitkomsten waar we in dit onderdeel naar zullen kijken zijn de afbraaksnelheid van de tape, het optreden van ontstekingsreacties of erodering van weefsel, het verloop van infecties bij aanwezigheid van de tape (mortaliteit, ontstaan van abscessen), en het functioneren van de tape bij aanwezigheid van infecties. Als maten voor invloed op de darmnaad zal ook worden gekeken naar tekenen van lekkage en zal de sterkte van de naad worden bepaald door het meten van barstdruk en treksterkte. **Door de aanwezigheid van de tape en de bijkomende afbraak/ontstekingsreacties kunnen er op de lange termijn ook juist verzwakkingen in de naad ontstaan. Daarom zal in een deel van de dieren (nog nader te bepalen) ook de sterkte van de naad worden gemeten.**

Geplande experimentele opzet/groepen:

Degradatiereacties/snelheid:

Groepen 1a/b/c/d: Darmnaad met [REDACTED] + opoffering na 2/4/12/24 weken

Groepen 2a/b/c/d: Darmnaad zonder [REDACTED] + opoffering 2/4/12/24 weken

Contaminatie experimenten:

Groep 1: contaminatie buikholte (controle)

Groep 2: contaminatie buikholte met kleine hoeveelheid [REDACTED]

Groep 3: contaminatie buikholte met grote hoeveelheid [REDACTED]

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

Interventies

Voor het bestuderen van de langetermijneffecten zal in enkele groepen onder algehele narcose een darmnaad worden aangelegd, die wel of niet met ██████ wordt afgeplakt. In de andere groepen zal enkel een laparotomie (zonder darmnaad) worden verricht waarbij er ██████ op enkele plaatsen in de buikholte wordt aangebracht.

Voor het bestuderen van de invloed van contaminatie zullen we gebruik maken van een model waarbij er bacteriën in de buikholte worden ingebracht. Er zijn hiervoor twee modellen bekend, waar we beiden ervaring mee hebben. Het ene model betreft het 'Cecal Ligation Puncture'(CLP) model, waarbij met een holle naald een gaatje in het coecum wordt geprikt zodat de inhoud de buikholte in gaat. Het andere model betreft het inoculeren van de buikholte met een combinatie van fecale vezels en een bekende hoeveelheid van twee soorten bacteriën (*E.coli* en *B.fragilis*). Bij beide modellen wordt er een dag na de initiële contaminatie een laparotomie gedaan, waarbij de buik wordt gespoeld en het buikschort chirurgisch wordt verwijderd, omdat de gevolgen van de infectie te beperken. Afhankelijk van de groep, zal er bij deze laparotomie ook ██████ in verschillende hoeveelheden worden ingebracht. De keuze van het contaminatiemodel zal worden gemaakt na afronding van deel 3.4.4.2.

Duur van experimenten

In de langetermijn/degradatie experimenten zullen dieren op verschillende tijdstippen tussen 1 en 24 weken worden opgeofferd. In deze series zullen we ██████ ook plaatsen op andere organen in de buikholte, zoals de buikwand en lever. Het gebruik van meerdere stukken ██████ op meerdere organen levert meer informatie op per dier. Omdat er een kans bestaat dat de ██████ tegen deze organen aankomt te liggen en ██████ in de toekomst eventueel ook op deze organen gebruikt zou kunnen worden, is het relevant om ook andere organen dan de darm te gebruiken.

In de contaminatie experimenten zullen de dieren op dag 5 worden opgeofferd. Uit eerdere projecten is gebleken dat dit de optimale dag is om de gevolgen van de infectie te onderzoeken en om tegelijkertijd het ongerief van de dieren zoveel mogelijk te beperken.

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

Allereerst hebben we dit onderdeel van het project verdeeld in twee stadia, namelijk het onderzoeken van de lange termijneffecten (en afbraak), en de effecten van contaminatie. Mocht uit de eerste serie experimenten blijken dat er ernstige lange termijncomplicaties optreden, dan zal er niet aan de volgende serie begonnen worden.

Daarnaast zal er per experiment een weloverwogen berekening of beredenering worden gedaan voor het bepalen van de groepsgrootte. Hierbij zullen we gebruik maken van onze ruime hoeveelheid aan data voor het inschatten van de uitkomsten van de controlegroepen. Omdat we met name proportionele uitkomstmaten gebruiken, maken we gebruik van de *sample size calculator* op <http://www.select-statistics.co.uk/sample-size-calculator-two-proportions> .

B. The animals

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

Soort: Rat
Ras: Wu (Wistar)
Geslacht: Mannelijk
Leeftijd: 2-3 maanden / tussen 230 en 280 gram
Herkomst: ██████████

Geschatte aantallen:

Het aantal benodigde groepen en dieren in dit onderdeel zal gedeeltelijk afhangen van de uitkomsten van onderdeel 3.4.4.2. In dat onderdeel zullen al een eerste indicatie krijgen van de weefselreacties en eventuele afbraak na 1 week. Aan de hand daarvan kunnen we het benodigde aantal dieren voor dit onderdeel beter bepalen. Zoals aangegeven in sectie 2A zullen we voor het bepalen van de uiteindelijke aantallen zoveel mogelijk gebruik maken van statistische methodes. Bij eerdere experimenten naar veiligheid bij contaminatie was de benodigde groepsgrootte gemiddeld 15 ratten per groep. Daarom hebben we dit aantal ook gebruikt als schatting voor het benodigde aantal dieren voor het betreffende onderdeel (zie Tabel 1).

Tabel 1 – Geschatte aantal dieren

Dierproef 3.4.4.3	Geschatte aantal groepen	Gemiddelde n per groep	Geschatte aantallen
Afbraaksnelheid en reacties lange termijn	8	10	80
Veiligheid contaminatie	3	15	45
Eventuele uitbreiding/herhaling			55
Totaal			180

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat	██████████	180	2-3 maanden

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Vervanging& vermindering

In de ontwikkelingsfase van █████ is gebruikt gemaakt van *in vitro* testen om een indicatie te krijgen van de afbraaksnelheid. Dit draagt bij aan het kiezen van de juiste opoffermomenten voor de dierproeven, en daarmee tot het verminderen van het benodigde aantal dierproeven.

Er is gezocht naar de mogelijkheid om zonder dierproeven de afbraak van lichaamsvreemd materiaal in de buikholte te bestuderen, maar hier werden geen adequate modellen voor gevonden. Hetzelfde geldt voor het bestuderen van het verloop van een infectie in de buikholte. Deze processen zijn dermate complex dat er (nog) geen geschikte *in vitro* modellen hiervoor zijn.

Verfijning

Door ons te houden aan de verschillende onderzoeks- en publicatierichtlijnen (ARRIVE, FELASA, SYRCLE's gold publication standard) streven we naar een zo hoog mogelijke kwaliteit van onze experimenten. Daarbij maken we gebruik van maatregelen om de kans op bias te verminderen (randomisatie, blinding) en doen we de operaties met aseptische technieken om de kans op infectieuze complicaties van buitenaf te verminderen. Tenslotte proberen we het dierenleed zoveel mogelijk te beperken door adequate verzorging. De dieren worden gehuisvest volgens vigerende protocollen. Ze zullen na de operatie gedurende 48 uur pijnstilling krijgen om de kans op pijn als gevolg van de operatie te beperken. Ook zullen de dieren aan het eind van de operatie extra vocht toegediend krijgen om uitdroging te voorkomen. Daarnaast zullen de dieren dagelijks geïnspecteerd

worden op tekenen van lijden. Humane eindpunten worden bepaald om de kans op inhumaan lijden te minimaliseren (zie sectie J. Humane eindpunten).

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

Verwerkt in sectie D.1.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

█ is een nieuw ontwikkeld product en derhalve niet eerder onderzocht. Er is een review gedaan naar zogenoemde tissue-adhesives, waaruit eveneens is gebleken dat er nog geen vergelijkbaar product is onderzocht.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

G. Location where the animals procedures are performed

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Voor (gas)anesthesie wordt gebruik gemaakt van isofluraan

Voor analgesie wordt gebruik gemaakt van Buprenorphine

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Na een buikoperatie is er altijd sprake van een herstelperiode van ongeveer 2 dagen. In deze periode kunnen de dieren last hebben van buikpijn, verminderde eetlust en vermoeidheid. Om dit te beperken wordt er tot 48 uur na de operatie pijnstilling gegeven. Indien nodig wordt het voedsel in de kooi gelegd en worden er drinkflessen met lange tuiten geplaatst om het eten en drinken te vergemakkelijken.

In de groepen waar we kijken naar langetermijneffecten en afbraaksnelheid kunnen er op den duur mogelijk andere complicaties ontstaan, zoals ontstekingsreacties met buikpijn, of darmobstructie door verklevingen. De kans hierop is moeilijk te voorspellen.

Bij het aanleggen van een darmnaad bestaat er een kans op lekkage van de naad. Bij ratten is deze kans klein (<10%). Mocht er lekkage optreden, dan zijn de gevolgen bij normale naden meestal beperkt. Het gepaard vaak met minimale abcessen en verklevingen waar de dieren weinig last van lijken te hebben. In een enkel geval kan er sprake zijn van pusvorming rond de naad, darmobstructie of gegeneraliseerde peritonitis, waar de ratten erg ziek van kunnen worden.

Bij de dieren waar de buikholtte wordt gecontamineerd is er een grotere kans op infectieuze complicaties. Bij vrijwel alle dieren treden er kleine abcessen op. Bij een deel van de dieren treedt er gegeneraliseerde peritonitis op, waarbij septische shock of overlijden kan optreden.

Alle dieren worden elke dag geobserveerd. Indien de klinische conditie hiertoe aanleiding geeft, zullen die dieren vaker worden geobserveerd en, om onnodig lijden te voorkomen, tijdig uit het experiment worden gehaald als een humaan eindpunt wordt bereikt (zie sectie J.).

Explain why these effects may emerge.

Verwerkt onder I.1

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

Verwerkt onder I.1

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Het humane eindpunt wordt bereikt in het geval van een sterk verslechterde conditie, af te meten aan uiterlijke kenmerken zoals sterk verminderde activiteit, lichaamstemperatuur, bolle rug, opstaande haren en brilogen, ingevallen of juist bolle buik. Het kan zijn dat de dieren enkele dagen last hebben van diarree. Dit is helaas inherent aan de ingreep en beschouwen wij op zichzelf niet als een humaan eindpunt. Ook bij een gewichtsverlies van meer dan 20% ten opzichte van het startgewicht, of een verlies van meer dan 15% binnen 2 dagen, wordt het humane eindpunt bereikt.

Indicate the likely incidence.

De kans op complicaties na een laparotomie bij de rat is zeer klein. Ook schatten we de kans op complicaties door het aanbrengen van █████ in als zeer beperkt. Derhalve verwachten we in de lange termijn experimenten dat het percentage dieren dat het humane eindpunt haalt kleiner is dan 5%.

Uit eerdere projecten blijkt dat de kans op het behalen van het humane eindpunt in de contaminatiegroepen rond de 20% ligt.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

In de degradatiestudies, welke 50% van dit onderdeel innemen, schatten we het ongerief in als Matig.

In de contaminatiegroepen schatten we het ongerief bij het grootste aantal dieren (70-90%) in als matig, en bij 10-30% als ernstig. Daarmee komt het cumulatief ongerief op ernstig.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Voor alle experimenten in dit project is het nodig om aan het eind van de proef de buikholte te inspecteren op de toestand van de tape en de buikorganen. Hiervoor moeten de dieren opnieuw geopereerd worden. Daarnaast hebben we zowel het bloed als de darmen van de ratten nodig voor aanvullende analyses. Daarom zullen de dieren aan het eind van het experiment worden opgeofferd.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 4	Type of animal procedure 3.4.4.4 Veiligheid en effectiviteit - varken

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

De doelen van dit onderdeel zijn:

- bepalen van het risico op complicaties (met name darmvernauwingen) op de korte termijn
- bepalen van de effectiviteit in het versterken van de naad en het voorkomen van naadlekkage
- bepalen van de risico's op lange termijn

We zullen hiervoor gebruik maken van een varkensmodel voor darmnaadgenezing. Om het meest geschikte diermodel te bepalen, hebben we een systematische review gedaan naar alle dierenstudies op het gebied van darmnaadgenezing in de afgelopen 60 jaar (1300+ artikelen). Hieruit is o.a. gebleken dat er voor onderzoek naar medische hulpmiddelen (zoals mechanische *staplers*) vooral varkens worden gebruikt, omdat de darmgrootte van deze dieren vergelijkbaar is met die van de mens. De tape die in dit project wordt onderzocht is ook een medisch hulpmiddel met specifieke eigenschappen, zoals dikte, sterkte en elasticiteit, die bedoeld zijn voor de mens. Omdat voor het bestuderen van het algemeen functioneren van de tape (i.e. behoud plakkracht, interactie met lichaamswefsel) de darmgrootte niet van belang is, hebben we in onderdeel 3.4.4.1 gebruik gemaakt van de rat. Echter, voor het bepalen van de (humane translatie van) effectiviteit en het risico op complicaties is de diameter van de darm wel relevant. Een belangrijke complicatie die in theorie zou kunnen optreden is een obstruerende vernauwing van de darm. Omdat we een reële inschatting willen maken van het risico hierop bij gebruik van de tape in mensen, maken we hiervoor gebruik van een varkensmodel met een normale darmnaad. Voor het bepalen van de effectiviteit van [REDACTED] ter preventie van naadlekkage (vergelijkbaar met de mens) zullen we een translatie model gebruiken waarbij lekkage geïnduceerd wordt door het compromitteren van de naadgenezing. Dit is een model dat ook wordt aanbevolen door een reviewstudie naar diermodellen voor naadlekkage (Pommergaard, Eur Surg Res 2011; Nordentoft, Eur Sur Res, 2007).

Geplande experimentele opzet/groepen:

Normale darmnaad korte termijn:

Groep 1a/b: dunne darmnaad met/zonder [REDACTED]

Groep 2a/b: dikke darmnaad met/zonder [REDACTED]

Gecompromitteerde naad:

Groep 3a/b: defecte dikke darmnaad met/zonder [REDACTED]

Groep 4a/b: defecte dunne darmnaad met/zonder [REDACTED]

Lange termijn risico's"

Groep 5a/b: darmnaad met/zonder [REDACTED], opoffering na 1 maand

Groep 6a/b: darmnaad met/zonder [REDACTED], opoffering na 6 maanden met tussentijdse inspectie.

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

Interventies

Voor alle dieren geldt dat onder algehele narcose een laparotomie wordt verricht waarbij er een darmnaad zal worden aangelegd. De controlegroepen uitgezonderd zal [REDACTED] vervolgens om de darmnaad worden aangebracht. Tevens zullen er enkele variaties worden toegepast om de relevantie hiervan op het functioneren van [REDACTED] te onderzoeken. Zo zullen er groepen worden gebruikt waarbij de naden ofwel in de dunne darm, ofwel in de dikke darm zullen worden aangelegd. Omdat er tussen deze segmenten verschillen zijn in diameter, de uitrekbaarheid en in de consistentie van de faeces, kan ook het risico op vernauwingen erg verschillen.

In de experimenten naar de preventie van naadlekkage zal de naad gecompromitteerd worden door het maken van een defect (21mm) in de naad (Nordentoft, Eur Sur Res, 2007).

In de experimenten naar de langetermijneffecten willen we op verschillende tijdstippen in het eerste half jaar de darmnaad inspecteren, om te onderzoeken in welke mate er verklevingen ontstaan en welke overige processen er op treden (bv. geleidelijke fibroserende vernauwing of erosie van tape in de darm). Om het aantal dieren hiervoor te beperken zullen we, in plaats van het gebruik van meerdere opoffermomenten, gebruik maken van tussentijdse inspectie door middel van een reoperatie en/of endoscopie. De precieze planning van deze momenten zal afhangen van de uitkomsten van de degradatiestudies in onderdeel 3.4.4.1 en van de situatie in de varkens na 1 week. In de lange termijn experimenten zullen we [REDACTED] ook plaatsen op andere organen in de buikholte, zoals de buikwand en lever. Het gebruik van meerdere stukken [REDACTED] op meerdere organen levert meer informatie op per dier. Omdat er een kans bestaat de [REDACTED] in contact komt met deze organen en [REDACTED] in de toekomst eventueel ook op deze organen gebruikt zou kunnen worden, is het relevant om ook de effecten op andere organen te onderzoeken.

Duur van experimenten

Omdat de kans op complicaties en naadlekkage het grootst is in de eerste week na de operatie, zullen de dieren in de eerste serie van experimenten niet langer dan een week in het experiment zitten. Voor onderzoek naar de lange termijn complicaties zullen de dieren tot aan een half jaar in het experiment blijven.

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

Allereerst hebben we dit onderdeel van het project verdeeld in twee stadia, namelijk het onderzoeken van het functioneren op korte termijn en onderzoek naar de complicaties op de lange termijn. Mocht uit de eerste serie experimenten blijken dat [REDACTED] niet naar verwachting functioneert, zal er niet aan de lange termijn serie begonnen worden.

Ook zullen we in dit onderdeel gebruik maken van enkele pilotexperimenten waarbij de gebruikte modellen getest zullen worden. Zowel het model voor normale darmnaden als het model voor gecompromitteerde darmnaden zullen elk in 1 tot 2 varkens getest worden, voordat er experimenten met grotere groepen tegelijk worden gedaan. Zo kunnen ook de gebruikte technieken geoefend worden, kan ervaring worden opgedaan met de uiting en de gevolgen van lekkage, kan ervoor worden gezorgd dat in het experiment minder hinder is van onvoorziene factoren en wordt een eventuele bias door leercurve verminderd.

Daarnaast zal er per experiment een weloverwogen berekening of beredenering worden gedaan voor het bepalen van de groepsgrootte. Hierbij zullen we gebruik maken van ervaring uit de pilot experimenten, en van gegevens uit de literatuur (Nordentoft, Eur Sur Res, 2007). Omdat we met name proportionele uitkomstmaten gebruiken, maken we gebruik van de *sample size calculator* op <http://www.select-statistics.co.uk/sample-size-calculator-two-proportions>.

B. The animals

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

Soort: Varken
Ras: Z- of Z/N-lijn
Geslacht: Vrouwelijk
Gewicht: 40-60 kg
Herkomst: XXXXXXXXXX

Dierproef 3.4.4.4	Geschatte aantal groepen	Gemiddelde n per groep	Geschatte aantallen
Pilot normale darmnaad en gecompromitteerde naad	2	1-2	4
Experiment normale darmnaad (dunne/dikke darm, met/zonder GATT)	4	4-8	24
Experiment gecompromitteerde naad	4	10	40
Langetermijneffecten	4	4-6	24
Eventuele uitbreiding/herhaling			20
Totaal			112

Geschatte aantallen:

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Varkens		112	40-60kg

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Vervanging

In de ontwikkelingsfase van █████ is gebruikt gemaakt van *ex vivo* experimenten (o.a. op varkensdarm uit het slachthuis) om de effectiviteit van verschillende prototypen te onderzoeken. Door daarbij de *in vivo* situatie te simuleren (o.a. met behulp van warmtebaden en peristaltische bewegingen) kon het gebruik van dierproeven voor het betreffende onderzoek vermeden worden.

Wanneer twee darmdelen aan elkaar worden gehecht, volgt er een complex genezingsproces, waarin veel lokale en systemische factoren hun effect uitoefenen. Het is nog onmogelijk om een volledige darmgenezing te simuleren in een *in vitro* model. Het varken is in deze situatie gekozen om de effectiviteit en eigenschappen van de tape *in vivo* te bestuderen. Het dient als model voor de humane situatie, vanwege de vergelijkbare intestinale anatomie, darmomvang, voedingspatroon (omnivoor) en wondgenezing.

Vermindering

Door gebruik te maken van pilotstudies, door het project te verdelen in meerdere stadia, en door gebruik te maken van groepsgrootte berekeningen voor elk experiment, proberen we het benodigde aantal dieren zo klein mogelijk te houden.

Verfijning

Door ons te houden aan de verschillende onderzoeks- en publicatierichtlijnen (ARRIVE, FELASA, SYRCLE's gold publication standard) streven we naar een zo hoog mogelijke kwaliteit van onze experimenten. Daarbij maken we gebruik van maatregelen om de kans op bias te verminderen (randomisatie, blinding) en doen we de operaties met aseptische technieken om de kans op exogene infectieuze complicaties te verminderen. Tenslotte proberen we het dierenleed zoveel mogelijk te beperken door adequate verzorging. Ze zullen na de operatie gedurende 48 uur pijnstilling krijgen om de kans op pijn als gevolg van de operatie te beperken. Ook zullen de dieren tijdens en na de operatie extra vocht toegediend krijgen om uitdroging te voorkomen. Daarnaast zullen de dieren dagelijks geïnspecteerd worden op tekenen van lijden. Humane eindpunten worden bepaald om de kans op inhumane lijden te minimaliseren (zie kopje humane eindpunten).

Het ongerief wordt zo laag mogelijk gehouden door het toepassen van algehele anesthesie en pijnstilling. Omdat we dit project in stappen hebben opgebouwd, zal de werking van de tape eerst bestudeerd worden in modellen waarbij naadlekkage onwaarschijnlijk is. Om vervolgens te preventieve werking te bestuderen, moeten we een model gebruiken waarin deze lekkage op kan treden. Wanneer er een lekkage optreedt resulteert dit overigens niet per definitie een peritonitis, maar in de meeste gevallen een lokale ontstekingsreactie of abcedering. Omdat deze complicatie meestal binnen 1 week optreedt, wordt het lekkage experiment nadien beëindigd. Als eerder blijkt dat de conditie van een dier verslechtert, zal het eerder uit het experiment gehaald worden. Daarmee wordt de duur van een eventueel ongerief als gevolg van peritonitis beperkt.

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

Verwerkt onder D.1

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Er is een systematische review gedaan, welke gepubliceerd wordt in het British Journal of Surgery, waarin alle dierstudies naar darmnaadgenezing zijn bekeken. Hieruit is gebleken dat de geplande experimenten niet eerder zijn uitgevoerd. Bovendien is ██████ een nieuw ontwikkeld product dat nog niet eerder is onderzocht. Ook biochemisch vergelijkbare producten zijn niet voorhanden om hypothesen op de baseren.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

De anesthesie en analgesie wordt volgens de geldende protocollen binnen het cdl uitgevoerd.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Na een buikoperatie is er altijd sprake van een herstelperiode van ongeveer 2-3 dagen. In deze periode kunnen de dieren last hebben van buikpijn, verminderde eetlust en vermoeidheid. Om dit te beperken wordt er in deze periode pijnstilling gegeven.

Bij het aanleggen van een darmnaad is er een kans op lekkage van de naad. In de normale darmnaden bij varkens is deze kans zeer klein. Zelfs als er defecten in de naad worden gemaakt van 5-6 mm resulteert dit meestal niet in lekkage (Nordentoft, Eur Sur Res, 2007) . In de experimenten waarbij de naadgenezing wordt gecompromitteerd, bijvoorbeeld door grotere defecten, is deze kans bijna 100% (Nordentoft, Eur Sur Res, 2007). Dit is inherent aan het experiment en nodig om te onderzoeken of de complicatie voorkomen kan worden. In de beschreven modellen is er bijna altijd sprake van peritonitis. Hiervan kunnen de dieren erg ziek worden en zelfs overlijden. Ook is er een kans op darmvernauwingen waardoor er darmobstructie ontstaat. Dit kan resulteren in buikpijn, misselijkheid en diarree. Het onderzoeken van de kans is op deze complicatie is een van de doelen van het huidige project.

Explain why these effects may emerge.

Verwerkt onder I.1.

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

Alle dieren worden elke dag enkele malen geobserveerd. Indien de klinische conditie hiertoe aanleiding geeft, zullen die dieren vaker worden geobserveerd en, om onnodig lijden te voorkomen, tijdig uit het experiment worden gehaald als een humaan eindpunt wordt bereikt (zie sectie J.).

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Het humane eindpunt wordt bereikt in het geval van een sterk verslechterde conditie. Bij varkens wordt onder andere gelet op gewichtsafname (meer dan 20%), aanhoudende koorts, apathisch gedrag, slechte voeropname, geen ontlasting. In geval van verslechterde conditie wordt contact opgenomen met de dierenarts om te overleggen over verder beleid (behandeling, of uit experiment halen).

Indicate the likely incidence.

In de proeven waarbij de darmnaden niet worden gecompromitteerd schatten we de kans op het behalen van het humane eindpunt onder de 5 %. In de dieren waarbij de darmnaad wordt gecompromitteerd schatten we deze kans in tussen 5-20%.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

In de groepen met normale darmnaden (**57%**) schatten we het ongerief in als Matig.

In de groepen met verhoogde kans op lekkage (**43%**) bestaat er een kans op Ernstig ongerief, welke we schatten tussen de 10 en 25% voor de groepen waarin tape wordt gebruikt, en tussen de 50 en 75% voor de groepen waarin geen tape wordt gebruikt.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Voor alle experimenten in dit project is het nodig om aan het eind van de proef de buikholte te inspecteren op de toestand van de tape en de buikorganen. Hiervoor moeten de dieren opnieuw geopereerd worden. Daarnaast zijn de buikorganen, en met name de darmnaad, nodig voor weefselanalyses. Om de dieren het herstel van een extra buikoperatie te besparen worden ze aan het eind van het experiment opgeofferd.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0013
2. Titel van het project: Tape ter preventie darmnaadlekkage
3. Titel van de NTS: Het gebruik van een tape om operatieve verbindingen tussen darmen af te dichten.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 27-03-2015
 - in vergadering besproken: 07-04-2015
 - anderszins behandeld: nvt
 - termijnonderbrekingen van 15-04-2015 tot 30-06-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
 - aanpassing aanvraag: 10-08-2015
 - advies aan CCD: 31-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 15-04-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - -3.3 Hier worden andere aantallen genoemd dan in de 'description of animal procedures'. De onderzoekers worden verzocht de genoemde aantallen in overeenstemming met elkaar te brengen.
 - **Project Proposal:**
 - - 3.2. De commissie is van mening dat in onderzoeksvraag 6 (incidentie en/of ernst van naadlekkage) de hoofddoelstelling van het project is verwoord. Is het voor preventie van naadlekkage wel noodzakelijk dat de tape de darmnaad feitelijk verstevigt, c.q. de sterkte

zoals gemeten aan de gebruikelijke mechanische parameters verhoogt? Versterking van de darmnaad kan wel als afgeleide vraagstelling vermeld worden.

- 3.4.1. stap 2. De onderzoekers bestuderen de effectiviteit van █████ ter versteviging van darmnaden. Is het noodzakelijk dat █████ de darmnaden kan verstevigen, en zouden de onderzoekers daarom 'versteviging van darmnaden' niet beter vervangen door 'preventie van darmnaadlekkage'? Het gaat er immers primair om te voorkomen dat lekkage in de darmwand leidt tot klinische verschijnselen. Zij worden verzocht dit aan te passen of aan te geven waarom zij dit willen handhaven.
- **Description of Animal Procedures:**
- -Dierproef 1, 2A. tweede vraag. De onderzoekers gaan darmnaden aanleggen. Onduidelijk is nog waar in het colon en waarom zij dit zowel in het ileum als het colon willen doen. Zij dienen dit te onderbouwen.
- -Dierproef 2, 2A eerste vraag. De commissie is van mening dat preventie van naadlekkage de hoofddoelstelling is. Sterkte van de darmnaad is niet noodzakelijk voor dit project en dient daarom als subdoelstelling vermeld te worden. De onderzoekers willen op twee tijdstippen dieren opofferen, maar vermelden dit niet in de globale proefopzet. Het aantal groepen komt daarmee op $6 \times 2 \times 2 = 24$. Indien dit invloed heeft op het totaal aantal dieren, kunt u dit onder B aanpassen.
- -Dierproef 2, 2A tweede vraag. Bij ratten treedt zeer zelden naadlekkage op bij normale darmnaden. Waarom wordt het effect van █████ op de normale darmnaad onderzocht? De onderzoekers dienen dit te onderbouwen.
- -Dierproef 2, 2A tweede vraag. Hef effect van █████ op de gecompromitteerde naad wordt in twee modellen onderzocht. Waarom gebruiken de onderzoekers twee modellen? En waarom kijken ze op dag 7? De naadlekkage ontstaat al voorafgaand aan dag 3 en bij wachten tot dag 7 zal circa 25% van de ratten prematuur aan peritonitis overlijden. Zij worden verzocht dit toe te lichten.
- Dierproef 2, J. Het percentage dieren dat het humane eindpunt haalt is te laag ingeschat.
- Dierproef 2, K. 0-10% is een onderschatting, de DEC meent dat dit 25% moet zijn (vd Vijver et al., Int J Colorect Dis 2013). Bij differentiatie in ongeriefclassificatie, dienen de geschatte percentages dieren te worden vermeld waarop deze verschillende ongeriefinschattingen betrekking hebben.
- -Dierproef 3, 2A De onderzoekers beschrijven hier in feite twee verschillende proeven. Zij worden verzocht in volgende aanvragen voor elke dierproef een aparte beschrijving te geven.
- -Dierproef 3,2A Waarom testen de onderzoekers de barstdruk en treksterkte na 2-4-12-24 weken? De verwachting is dat de naad op deze tijdstippen sterker is dan het omringende weefsel en dat de gemeten waarden niet representatief zijn voor de sterkte van de darmnaad per se. Zij worden verzocht dit toe te lichten.
- -Dierproef 4, K. Bij differentiatie in ongeriefclassificatie, dienen de geschatte percentages dieren te worden vermeld waarop deze verschillende ongeriefinschattingen betrekking hebben.
- Datum antwoord: 30-06-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**

- -3.3 We hebben de aantallen aangepast. Bij de genoemde aantallen in de NTS hebben we de extra dieren, die we mogelijk nodig hebben voor eventuele uitbreiding, nog niet meegerekend.
- **Project Proposal:**
- -3.2. Het klopt dat onderzoeksvraag 6 de hoofdvraag is. Voor de duidelijkheid hebben we de volgorde en opbouw van de alinea met vragen veranderd (zie projectaanvraag sectie 3.2). Voor de preventie van naadlekkage is het, strikt genomen, niet absoluut noodzakelijk om een normaal genezende darmnaad extra te verstevigen. Echter, om te zorgen dat er geen lekkage optreedt is het wel nodig dat de tape ervoor zorgt dat de naad niet verzwakt. Preventie van zwaktes is zeer nauw gerelateerd aan de mate van versteviging en is een essentieel aspect bij de toepassing van de tape. Als blijkt dat de tape in staat is normale darmnaden te verstevigen, is het aannemelijker dat de tape ook in staat is bij gestoorde naadgenezing eventuele zwaktes te voorkomen. De barstdruk is een maat voor de 'afsluitende' werking van de tape en de treksterkte een voor de mate waarin de tape de hechtingen ondersteunt. Onderzoek naar de verstevigende werking is verbonden met het doel van naadlekkage preventie en is derhalve een belangrijk onderdeel van dit project. Deze toelichting is verwerkt in sectie 3.4.1 van de projectaanvraag.
- - 3.4.1. Een deel van de beantwoording van deze vraag is hierboven gegeven. Natuurlijk is preventie van darmnaadlekkage klinisch de meest relevante uitkomst. Echter, op de onderzoeksrouten hierna toe is versteviging van de darmnaad een goede proxy. Bij de toepassing in de praktijk zal versteviging van bestaande technieken (hechtingen) ook de eerste stap zijn. Daarmee is versteviging een relevante uitkomst met translationele waarde. (Terzijde, complete vervanging van andere materialen, waarbij de darmnaad volledig afhankelijk is van de tape, zal een volgende stap zijn.)
- **Description of Animal Procedures:**
- *-Dierproef 1, 2A. tweede vraag.* Wij hebben dit onderbouwd door de volgende uitleg toe te voegen aan de aanvraag:
De darmnaden zullen worden aangelegd op verschillende plaatsen in de darm (ileum, of proximale colon), om te bepalen of de verschillen tussen deze delen (andere darmwand, andere diameter, andere fecale consistentie) invloed hebben op de werking van de tape. Door verschillen in fecale consistentie en uitrekking van de darm kan de tape mogelijk eerder loslaten of eerder obstructie veroorzaken. Bovendien worden het ileum en het proximale colon in dit *proof of principle* onderdeel gebruikt om te testen of beide darmdelen ook geschikt zijn om de toepassing van de tape verder te onderzoeken, zoals gepland in onderdeel 3.4.4.2.
- *-Dierproef 2, 2A eerste vraag.* We hebben de doelen nu onderverdeeld in een hoofd- en subdoelstelling. We hebben het aantal groepen in de globale proefopzet aangepast, en de onderbouwing hiervoor toegevoegd aan de paragraaf *duur van experimenten*.
- *-Dierproef 2, 2A tweede vraag.* We gebruiken het model voor normale darmnaadgenezing om de verstevigende werking van de tape te bepalen en hoe dit proces verloopt qua functie en qua pathofysiologie. Als we ontdekken dat er versteviging optreedt en weten hoe dit pathofysiologisch gaat is dit belangrijke informatie voor de naadlekkage modellen met de verwachting dat versteviging bij normale darmnaad ook versteviging geeft bij 'dreigend' lekkende naden. Ook kan versteviging van normale darmnaden nadelige gevolgen hebben zoals littekenreactie met obstructie en stricturering. Dit nadelige effect is beter te meten bij

normale darmnaden dan bij lekkende darmnaden omdat lekkage en bacteriële contaminatie hun eigen dynamiek hebben m.b.t. ontstekingsproces en genezingsproces met littekenvorming. We hebben deze toelichting aan de aanvraag toegevoegd.

- *Dierproef 2, 2A tweede vraag.* Het eerste model betreft 'diclofenac geïnduceerde naadlekkage' en het tweede model betreft een 'technisch insufficiënte naad'. In groepen 4 (ileumnaad) en 5 (proximale colonnaad) zal de genezing gestoord worden door diclofenac toediening, omdat we hiervan weten dat er een consequente hoeveelheid lekkage optreedt en omdat de pathogenese (i.e. 'geleidelijke' verstoring wondgenezing) relevant is in de klinische situatie. In de '6' groepen wordt de darmnaad gecompromitteerd door het verminderen van het aantal hechtingen. Het primaire doel hiervan is niet om lekkage te induceren, maar om te onderzoeken wat de ondersteunende werking van de tape ten opzichte van hechtingen is, en om te bestuderen of de tape ook de capaciteit heeft om grotere technische defecten af te dichten. In de normale klinische situatie is er meestal initieel geen sprake van grote defecten, maar kunnen deze wel secundair ontstaan als gevolg van genezingsstoornissen.

Betreft de relevantie van dag 7: Als lekkage in de eerste drie dagen voorkomen kan worden, betekent dit nog niet dat het in zijn geheel voorkomen kan worden. Het kan zijn dat het moment van klinisch relevante lekkage wordt uitgesteld door de tape, maar dat er in de loop van enkele dagen alsnog lekkage optreedt (in de humane situatie treedt lekkage ook regelmatig later op (tot en met 3 maanden) door afdekking van een lek met verklevingen). We hebben dag 7 redelijk arbitrair gekozen als een tijdstip waarop normaal de naad volledig genezen en sterk is, maar een subklinische lekkage vanwege de tape leidt tot klinische lekkage. Dag 7 zal alleen worden bestudeerd in de proximale colongroepen. De gevolgen van lekkage in het proximale colon zijn minder ernstig dan in het ileum en dus verwachten we minder ongerief. Bij eerdere experimenten was de mortaliteit 0% bij lekkage van een proximale colonnaad. Om onnodig ongerief te voorkomen zullen in de 'gestoorde naadgenezing' groepen de dag 7 groepen (5aD7/5bD7) alleen worden gedaan als op dag 3 al een verbetering blijkt met de tape.

- *Dierproef 2, J.* Over alle experimenten van de afgelopen 2 jaar was het percentage dieren dat het humane eindpunt heeft behaald lager dan 5 procent. Omdat het percentage in sommige groepen met gestoorde naadgenezing tussen de 6 en 7 procent is geweest en dit percentage kan variëren, hebben we het geschatte percentage voor deze aanvraag naar boven aangepast, namelijk naar 10%.
- *Dierproef 2, K.* Wij baseren onze schatting op de literatuur en de meer recente onderzoeksresultaten van de afgelopen 2 jaar (4 experimenten). Uit onze resultaten en ervaring blijkt dat er volgens de huidige definitie een ernstig ongerief was bij 12% in de ileum groepen en bij 0% in de proximale colon groepen. Dus voor het huidige project zou dat neerkomen op een gemiddelde van 2-3% in de lekkagegroepen, en dus in 1% van de totale dierproef. Uitgaande van eventuele variatie en onvoorziene omstandigheden houden we in deze proef rekening met een percentage van 10%. Derhalve menen wij dat 10% geen onderschatting is en hebben onze onderbouwing aan de aanvraag toegevoegd. Daarnaast hebben we ook de geschatte percentages vermeld bij de differentiatie in ongeriefscores.
- *Dierproef 3, 2A* In een volgende aanvraag zullen we dit apart beschrijven.
- *Dierproef 3,2A* Door de aanwezigheid van de tape en de bijkomende afbraak/ontstekingsreacties kunnen er op de lange termijn ook juist verzwakkingen in de

naad ontstaan. Daarom zal in een deel van de dieren (nog nader te bepalen) ook de sterkte van de naad worden gemeten. Deze toelichting hebben we verwerkt in de aanvraag.

- *-Dierproef 4, K.* Dit hebben we als zodanig verwerkt in de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'om een nieuwe tape (■■■■) te onderzoeken op effectiviteit (versteving van darmnaden en preventie van naadlekkage) en veiligheid (vreemd lichaamsreactie en infectie potentiering)'. De hoofddoelstelling is uitgewerkt in vier daar logisch uit voortvloeiende onderzoeksvragen. Het zal duidelijk worden of de nieuwe flexibele tape de frequentie of de ernst van darmnaadlekkage na het aanbrengen van een anastomose bij ratten en varkens kan verminderen, en of het product voldoende veilig is (met name voor wat betreft het risico op ernstige weefselreacties, het risico op het verergeren van een infectie en het risico op langetermijncomplicaties) om uit te testen in de kliniek. Een dergelijke flexibele tape zou gebruikt kunnen worden om anastomosen te versterken en lekkage uit een defecte anastomose te voorkomen. Darmnaadlekkage na operaties waarbij (een deel van) de darm verwijderd is, kent een prevalentie van 4-15% en resulteert in abscessen en buikvliesontsteking en gaat gepaard met een hoge mortaliteit. Dit fenomeen wordt algemeen beschouwd als de ernstigste complicatie na darmchirurgie. De DEC acht het daarom van groot belang dat er nieuwe, verbeterde methoden beschikbaar komen voor het beschermen van anastomosen. Dit onderzoek kan daaraan bijdragen en vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn wetenschappelijk verantwoord en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gebruikte diermodellen zijn robuust en goed reproduceerbaar. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de veiligheid en effectiviteit van ■■■■ ter preventie van darmnaadlekkage. De

resultaten van het onderzoek kunnen de basis vormen voor een mogelijke klinische toepassing bij de mens.

5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het ondergaan van een laparotomie onder volledige narcose en het bijkomen hieruit en de postoperatieve pijn en hinder -tijdens de genezing van de anastomose. Bij een deel van de dieren zal de genezing bewust worden gecompromitteerd door toediening van NSAIDs of het aanbrengen van minder hechtingen, waardoor de kans op naadlekkage toeneemt. Bij een aantal dieren wordt een infectie in de buikholte aangebracht, waarvoor ze vervolgens behandeld worden. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde (her)laparotomieën in als matig. De dieren die peritonitis ontwikkelen ervaren ernstig ongerief. Het cumulatief ongerief voor het beschreven project is daarom terecht ingeschat als matig voor 92% van de ratten en 87% van de varkens. De overige dieren ervaren ernstig ongerief.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd, voor de resterende onderzoeksvragen is onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het project wordt gefaseerd uitgevoerd waardoor onnodige dierproeven worden voorkomen. Waar nodig worden eerst pilotexperimenten uitgevoerd om ervaring op te doen met het gebruikte model. In de lange termijn experimenten met varkens worden meerdere stukken tape per dier aangebracht om meer informatie per dier te verkrijgen. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 630 ratten en 112 varkens.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie tijdens de operaties, en adequate pijnbestrijding, verzorging en controles na afloop van de buikoperaties. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het gebruik van een

flexibele tape ter preventie van darmnaadlekkage, en de mogelijke complicaties van dit gebruik op korte en lange termijn bij ratten en varkens. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een flexibele tape ter bescherming van anastomosen in de kliniek. Door velen wordt het optreden van naadlekkage beschouwd als de ernstigste complicatie binnen de heekunde. Het belang van het beschikbaar komen van materiaal dat darmnaadlekkage kan voorkomen, of de ernst daarvan kan beperken, acht de DEC dan ook substantieel, mede gezien de relatief hoge frequentie waarmee deze levensbedreigende complicatie optreedt na operaties waarbij een deel van de darm moet worden verwijderd en de continuïteit moet worden hersteld.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig – en ongeveer 10 % van de dieren ernstig - ongerief zullen ondervinden als gevolg van de laparotomie en de genezing van de aangebrachte anastomose, al dan niet onder verslechterde omstandigheden die zich ook in de kliniek kunnen voordoen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren. De experimenten komen qua design overeen met wat in dit onderzoeksveld gebruikelijk is.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- 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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



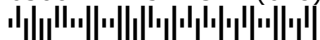
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015242

Bijlagen

2

Datum 15 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015242. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

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: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein-zuid 10
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: ██████████
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN (628)

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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: 10 oktober 2015
Geplande einddatum: 10 oktober 2020
Titel project: Tape ter preventie darmnaadlekkage
Titel niet-technische samenvatting: Het gebruik van een tape om operatieve verbindingen tussen darmen af te dichten.
Naam DEC: DEC Radboud Universiteit (Rudec)
Postadres DEC: Geert Groteplein 10 6525 GA Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 10 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015242

Bijlagen

2

Datum 15 september 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 15 september 2015

Vervaldatum: 15 oktober 2015

Factuurnummer: 15700242

Ordernummer: 2015-0013/

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015242	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

████████████████████

████████████████████

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015242

Datum 28 september 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 10 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Tape ter preventie darmnaadlekkage" met aanvraagnummer AVD103002015242. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In de Beschrijving Dierproeven geeft u aan mannelijke ratten en vrouwelijke varkens te willen gebruiken. Kunt u aangeven of het mogelijk is om ook vrouwelijke ratten te gebruiken? Kunt u daarnaast aangeven waarom u voor vrouwelijke varkens kiest?

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet

Bijlagen

1

compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

Datum

28 september 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015242



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Nijmegen

01-10-2015

Geachte leden van de CCD,

Naar aanleiding van uw brief waarin u vraagt om opheldering over het gebruik van mannelijke ratten en vrouwelijke varkens in ons project "Tape ter preventie darmnaadlekkage" (aanvraagnummer AVD103002015242), geven wij de hierna volgende uitleg:

Aangezien wij in een kleiner proefdier willen starten en al ruim 20 jaar ervaring hebben met darmanastomoses in mannelijke Wistar ratten, willen wij ook nu mannelijke ratten gebruiken. Hiermee waarborgen we dat er gebruik wordt gemaakt van een solide gevalideerd naadlekkage model. In de literatuur zijn er geen aanwijzingen dat naadlekkage bij vrouwelijke ratten anders verloopt dan bij mannelijke ratten. Toch als nu wordt overgegaan op vrouwelijke ratten is er een, weliswaar zeer kleine, mogelijkheid dat het model verrassingen laat zien en wij genoodzaakt zijn extra dieren te moeten gebruiken om het model te valideren. In de naadlekkage literatuur wordt ook bij voorkeur mannetjes gebruikt (Erginel, 2014; Ji, 2015). Dit maakt het mogelijk om uiteindelijke resultaten goed te vergelijken met die van andere groepen onderzoekers.

Het keuze voor het gebruik van vrouwelijke varkens hebben wij gebaseerd op advies vanuit het [REDACTED]. Binnen het [REDACTED] is er veel meer ervaring met vrouwelijke varkens, deze laten zich veel beter "handelen", zijn rustiger en bij vrouwelijke varkens is het inbrengen van een blaaskatheter via de urinewegen (atraumatisch) mogelijk in tegenstelling tot mannelijke varkens. Deze blaaskatheter is nodig voor de vocht monitoring tijdens de ingreep en het constant houden van de onderzoekscondities. Wij hebben geen aanwijzing dat de naadgenezing anders verloopt bij vrouwelijke in vergelijking met mannelijke varkens.

Samenvattend zijn er overwegend methodologische en praktische argumenten voor de keuze van het geslacht van het proefdier tegen de achtergrond dat er geen verschil lijkt te zijn in de pathofysiologie van naadgenezing en naadlekkage in de experimentele en klinische literatuur.

Wij hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

met vriendelijke groet

[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015242

Datum

18 NOV. 2015

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Tape ter preventie darmnaadlekkage" met aanvraagnummer AVD103002015242. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 2 oktober 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld. Het betreft de geslachten van de dieren.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10 lid 1a van de wet, wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Tape ter preventie darmnaadlekkage" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 oktober 2015 tot en met 10 oktober 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit (Rudec) gevoegd. Dit advies is opgesteld op 31 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. De CCD stelt wel algemene voorwaarden aan dit project. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

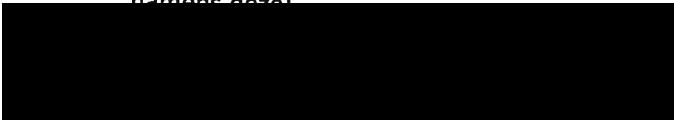
Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:


Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 oktober 2015 tot en met 10 oktober 2020, voor het project "Tape ter preventie darmnaadlekkage" met aanvraagnummer AVD103002015242, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit (Rudec).

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 september 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 september 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 31 augustus 2015, ontvangen op 10 september 2015.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 2 oktober 2015

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Proof of principle - rat	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar, 2-3 maanden	120	Matig / moderate	
Effectiviteit - rat	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar, 2-3 maanden	330	Ernstig / severe	
Veiligheid - rat	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar, 2-3 maanden	180	Ernstig / severe	
Veiligheid en effectiviteit - varken	Varkens (<i>Sus scrofa domestica</i>) / 40-60 kg, zeugen	112	Ernstig / severe	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

In alle dierproeven waar ratten worden gebruikt, worden mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplusdieren in voorraad moeten worden gedood. De aanvrager mag de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten, bij deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het

project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
NTS2015250									
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5			x					
9	Bijlage beschrijving dierproeven 6			x					
10	DEC-advies				x		x	x	
11	Appendix I				x		x	x	
12	Appendix II			x					
13	Overzicht aantallen dieren			x					
14	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
15	Advies CCD		x						x
16	Beschikking en vergunning				x		x	x	

Betreft:
AVD
80100 2015
250



20 OKT. 2015

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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 80102 (Hubrecht Instituut-KNAW) 80101 NIN
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	KNAW
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	5 4 6 6 7 0 8 9

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

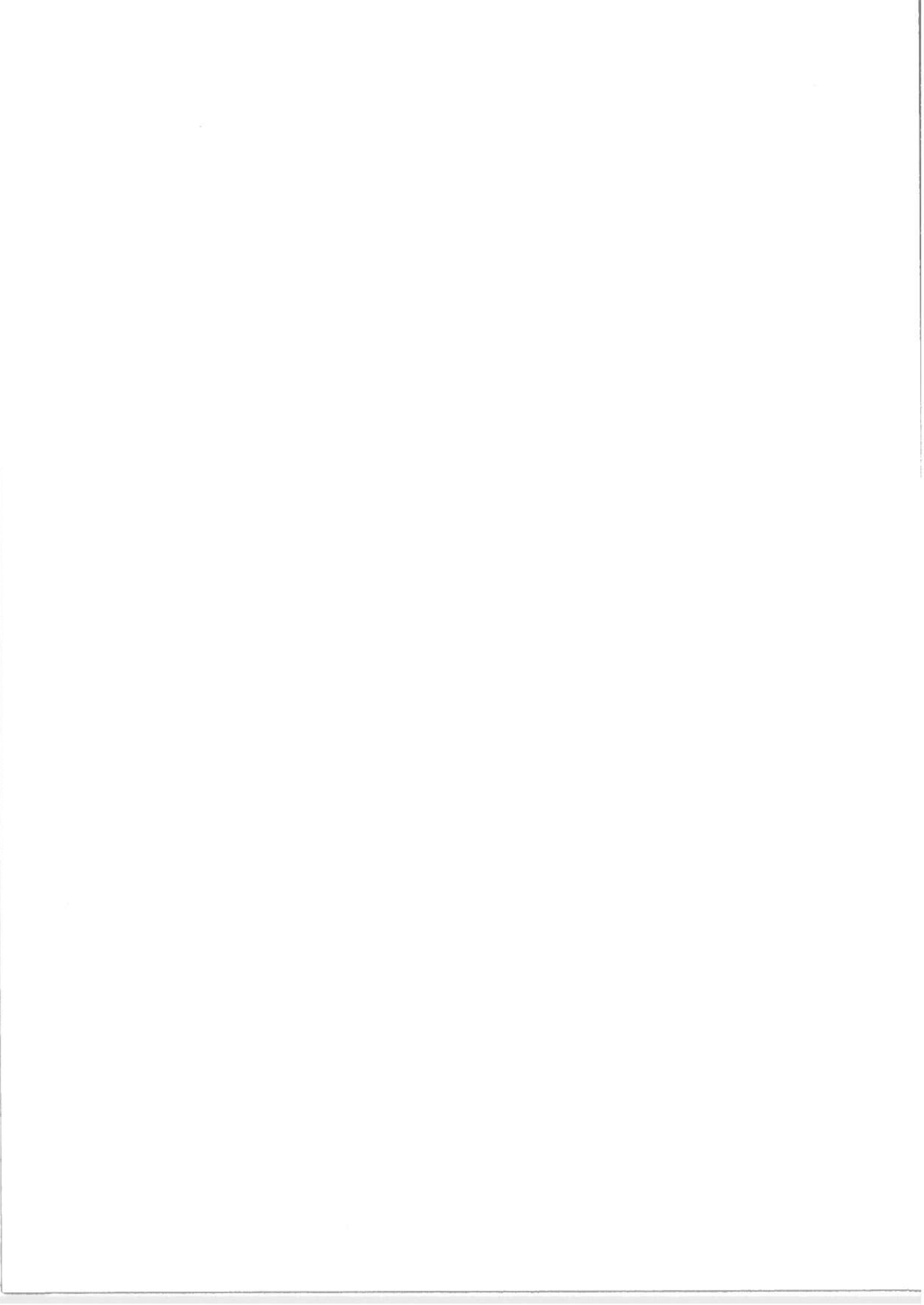
Straat en huisnummer	
Postbus	Postbus 19121
Postcode en plaats	1000GC Amsterdam
IBAN	NL94
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Hubrecht Instituut

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	Group Leader	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie		
Afdeling		
Telefoonnummer		
E-mailadres		



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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 1 1 . 2 0 1 5 |
| Einddatum | 0 1 . 1 1 . 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Factors involved in cardiac function and repair
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De moleculaire basis van hartziekten
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------|
| Naam DEC | DEC-KNAW |
| Postadres | Amsterdam |
| E-mailadres | |



4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- flow chart
- Table with experimental groups en Bijlagen I en II

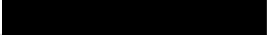
6 Ondertekening


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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:


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

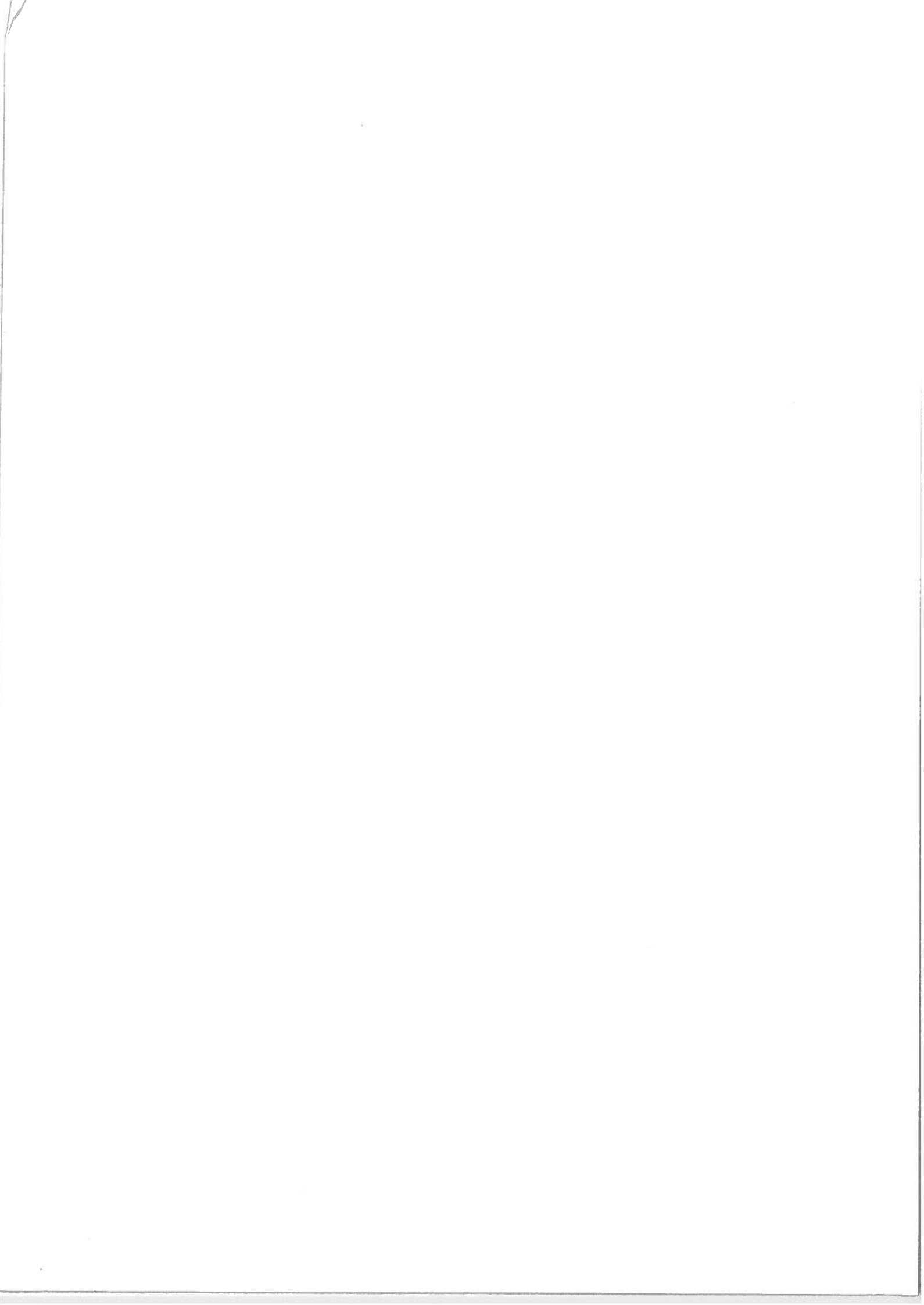
Naam 

Functie 

Plaats Amsterdam

Datum 14 - 10 - 2015

Handtekening 





Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

Heart failure¹ is a major public health issue in the industrialized world, associated with high morbidity and mortality rates and posing a major burden on the healthcare system. HF can be viewed as a progressive disease resulting from an *acute event*, such as myocardial infarction (MI), that results in the

loss of functional cardiac myocytes due to the inability of the heart to **regenerate and repair** the injured tissue². HF can also be caused by a *gradual event* such as increased hemodynamic pressure (hypertension) or by a genetic mutation all resulting in a **pathological remodeling** response, characterized by cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis, that induces a decline in cardiac pump function³.

In our lab aim to understand the molecular and cellular mechanisms that are involved in cardiac **regeneration and repair** and **pathological remodeling** by using animal models that allow for detailed analysis of the different aspects of heart disease. See **appendix I** for a brief overview of our results obtained so far with studies related to heart regeneration and pathological remodeling. Often the same mechanisms are involved in both types of heart failure and it is therefore of scientific value to study the involvement of a particular gene, microRNA, or (stem)cells, in experimental models of regeneration and repair and in models for pathological remodeling.

1. Cardiac regeneration and repair

Ischemic heart disease (IHD) is a form of congestive heart failure and is the leading cause of death worldwide⁴. IHD is induced by an insufficient blood supply of the heart muscle typically due to coronary artery disease or **myocardial infarction (MI)**. During an acute MI, the complete occlusion of coronary vessels impedes a sufficient oxygen supply to the heart muscle and the resulting hypoxia can induce loss of viable cardiac tissue. Currently, the most effective strategy for reducing the size of an infarct and improving the clinical outcome after an acute MI, is early myocardial reperfusion by either thrombolytic therapy or primary percutaneous coronary intervention. However, although restoration of the blood flow in response to an ischemic event has been shown to be beneficial, the ischemic event still leads to the loss of viable cardiac tissue and the infarct size is often correlated with an impairment of cardiac contractility. Cardiomyocytes are terminally differentiated cells that have lost the capability to divide. Consequently, the loss of contracting tissue is permanent and is only replaced by scar tissue. While the heart is notoriously resistant to regeneration in response to ischemic injury, considerable evidence suggest that the fundamental biology of the myocardium provides multiple therapeutic opportunities to enhance **cardiac regeneration and repair**. This can be achieved by stimulating cardiomyocyte survival, triggering myocyte proliferation, or by improving the recruitment and homing of stem cells, parameters which are all looked at in our lab. Improving heart repair by the replacement of lost cardiomyocytes will result in a better maintenance in cardiac function, that we can measure by echocardiography or other functional measurements (**see appendix I**).

Tissue surrounding the actual ischemic area is also affected, and typically shows a remodeling process that is characterized by hypertrophy of cardiac myocytes and fibrosis. This remodeling process further adds to the deterioration of the pump function, which can ultimately lead to heart failure and sudden death. Due to the high incidence and severity of IHD, much effort has been directed towards the search for strategies that can limit ischemic injury or secondary remodeling. Because an effect on regeneration (and the resulting infarct size) will influence the level of pathological remodeling are these 2 processes directly linked. Cardiomyocyte renewal, hypertrophy and fibrosis is successfully being studied in our lab as a read out for heart regeneration and pathological remodeling secondary to the infarct (**see appendix I**)⁵⁻⁷.

To study the biological mechanisms involved in cardiac regeneration and repair our lab currently uses the following two models of ischemic injury to the heart^{5,7}:

- **Myocardial infarction (MI)**: permanent occlusion of a coronary artery
- **Ischemia Reperfusion (IR)**: occlusion of a coronary artery, followed by reperfusion

2. Pathological remodeling

Cardiomyocyte hypertrophy is the dominant cellular response of the heart not only after MI, but occurs in response to virtually all forms of hemodynamic overload, endocrine disorders, or inherited mutations in a variety of structural and contractile proteins. These disease drivers activate a pathological remodeling response that causes the heart to become hypertrophic and fibrotic, decompensate and ultimately go into failure. As such, there has been intense interest in deciphering the fundamental molecular mechanisms

that drive cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis, so we can explore opportunities to protect the heart against these changes ³. Cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis is currently being studied in our lab as a read out for heart pathological remodeling (**see appendix I**) ^{5, 8-12}. Because all disease drivers activate different signaling cascades, depending on the specific research question our lab makes use of the following models to induce this pathological remodeling (**see appendix I**).

- **Transverse Aortic Banding** ¹³: A surgical model, in which the aorta is partially occluded with a trans-aortic band ¹³. This mimics the effect of atherosclerosis, causing a permanent narrowing of the vasculature because of plaque deposition. This narrowing of the aorta by the aortic constriction increases the workload on the heart by an increase in pressure, which results in pathological cardiac remodeling and dysfunction that is characterized by cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis that results in a worsening in cardiac function ¹².
- **High-salt diet** ^{8, 10}: Since hypertension is an important driver of cardiac disease and HF a lot of research is dedicated to study exactly what happens in the heart during this increase in blood pressure. In the lab we can elevate blood pressure by increasing the salt-content of the diet (high-salt diet) of mice.
- **Delivery of remodeling agent** ⁸: Remodeling agents, like angiotensin II (AngII), phenylephrine (PE) or cardiotrophin (CT-1) can be administered to induce a pathological remodeling response in the heart ^{8, 10}.
- **High-fat diet** ⁹: Another important cause of heart disease that is rapidly gaining ground is the Western diet. Because of unhealthy dietary habits there is an increasing incidence of people that are diagnosed with type II diabetes mellitus (DM), and these patients often die from cardiovascular disease. Heart disease in patients with diabetes is called diabetic cardiomyopathy and is characterized by myocyte hypertrophy, prominent interstitial fibrosis and diastolic dysfunction. To study the remodeling response of the heart in during diabetic cardiomyopathy and the underlying molecular changes we make use of an animal model of type II diabetes, which is based on a high-fat diet.
- **Exercise to trigger heart disease**: Inherited mutations in a variety of structural and contractile proteins can also be the underlying cause of specific forms of heart disease, like Arrhythmic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC) or Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM)¹⁴. These mutations induce a specific remodeling response, with all different underlying causes of heart disease. While the mouse models often appear resistant to developing the disease, we can use exercise to increase the workload on the heart and thereby triggering the disease. This mimics the situation in people, where people suddenly expose cardiac issues under conditions of intense physical activity.

Several groups, including our own, identified microRNAs (miRNAs) as crucial gene regulators during heart repair and pathological remodeling ^{5, 7, 10-12}. At the same time it is well known that physical exercise can decrease infarct size and pathological remodeling by enhancing cardiac regeneration and inducing a physiological remodeling response that is beneficial for the heart ¹⁵. Studying the effects of therapeutic interventions (such as microRNA-based treatments) or exercise on the heart will help us to better understand the potential beneficial effects of physical activity on heart disease.

Gender has a big influence on heart disease. Women are generally less susceptible for HF which is thought to be due to a cardioprotective effect of estrogen. Women show more replacement of cardiomyocyte after myocardial infarction, less hypertrophy and less fibrosis than men. The presence of estrogen influences the severity of heart disease and changes with age ¹⁶. Our group previously studied the impact of the contribution of estrogen, which appeared to be very significant in the setting of heart disease ⁶. While this is a very interesting and relevant observation, this is currently not a topic of investigation in our lab. To exclude this highly impactful variable, we (first) aim to understand the molecular mechanism of cardiac regeneration and remodeling only in male mice. While we are aware that this choice increases the required number of animals not used in our breeding schemes, we strongly believe that using only males will provide more reliable and consistent, less variable, data. Including females will introduce more variation, which will increase the number of animals required to get a significant result, and will increase the number of mice exposed to discomfort.

The overall theme in the [REDACTED] is to unravel the underlying molecular and cellular mechanisms of cardiac repair (cardiomyocyte renewal) and pathological remodeling (cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis) by using animal models that allow for detailed analysis of the different aspects of heart disease. Based on previous experiments, literature, interactions with other scientists and data obtained during the course of our studies we identify a novel mechanism that could potentially be relevant for heart disease. If possible we first test our hypothesis in isolated cardiomyocytes^{5, 11}, a well validated in vitro model to study heart biology, before we move to in vivo experiments. We use a genetic mouse model or other way of gene manipulation to understand the molecular mechanisms that are important for the heart. These mice are studied in the absence or presence of myocardial infarction or another type of cardiac stress to examine the molecular effects both under basal or cardiac stress conditions. This can be done in the absence or presence of a therapeutic intervention like an microRNA drug or exercise. Our work so far has formed the basis for the foundation of a biotechnology company called miRagen Therapeutics (**see appendix I**), that aims to develop new therapies for cardiovascular disease. Our work opens new avenues for a variety of new and/or improved therapeutic strategies for heart disease.

References

1. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009;324:1710-1713
2. Senyo SE, Lee RT, Kuhn B. Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Stem cell research*. 2014;13:532-541
3. van Berlo JH, Mailliet M, Molkenin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123:37-45
4. Cannon RO, 3rd. Mechanisms, management and future directions for reperfusion injury after acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005;2:88-94
5. Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM, Dalby CM, Robinson K, Stack C, Latimer PA, Hare JM, Olson EN, van Rooij E. Inhibition of mir-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res*. 2012;110:71-81
6. van Rooij E, Fielitz J, Sutherland LB, Thijssen VL, Crijns HJ, Dimaio MJ, Shelton J, De Windt LJ, Hill JA, Olson EN. Myocyte enhancer factor 2 and class II histone deacetylases control a gender-specific pathway of cardioprotection mediated by the estrogen receptor. *Circ Res*. 2010;106:155-165
7. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of mir-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:13027-13032
8. Dickinson BA, Semus HM, Montgomery RL, Stack C, Latimer PA, Lewton SM, Lynch JM, Hullinger TG, Seto AG, van Rooij E. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *European journal of heart failure*. 2013;15:650-659
9. Grueter CE, van Rooij E, Johnson BA, DeLeon SM, Sutherland LB, Qi X, Gautron L, Elmquist JK, Bassel-Duby R, Olson EN. A cardiac microRNA governs systemic energy homeostasis by regulation of med13. *Cell*. 2012;149:671-683
10. Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, van Rooij E. Therapeutic inhibition of mir-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation*. 2011;124:1537-1547
11. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:18255-18260
12. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007;316:575-579
13. Halkein J, Tabruyn SP, Ricke-Hoch M, Haghikia A, Nguyen NQ, Scherr M, Castermans K, Malvaux L, Lambert V, Thiry M, Sliwa K, Noel A, Martial JA, Hilfiker-Kleiner D, Struman I. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123:2143-2154
14. Cerrone M, Noorman M, Lin X, Chkourko H, Liang FX, van der Nagel R, Hund T, Birchmeier W, Mohler P, van Veen TA, van Rijen HV, Delmar M. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovascular research*. 2012;95:460-468
15. Bostrom P, Mann N, Wu J, Quintero PA, Plovie ER, Panakova D, Gupta RK, Xiao C, MacRae CA, Rosenzweig A, Spiegelman BM. C/EBPβ controls exercise-induced cardiac growth and protects

- against pathological cardiac remodeling. *Cell*. 2010;143:1072-1083
16. Ostadal B, Ostadal P. Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: Therapeutic implications. *British journal of pharmacology*. 2014;171:541-554

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The overall theme of our research is to unravel the underlying molecular and cellular mechanisms of cardiac repair (cardiomyocyte renewal) and pathological remodeling (cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis).

Our aim is to understand the molecular mechanisms that are involved in cardiac regeneration and remodelling.

Specific research aims are:

1. Understand the function of specific genes, microRNAs or (stem) cells in **heart regeneration** under basal and stress conditions by looking at the effect on cell death, proliferation and differentiation (Animal Procedures 1, 2, 3, 4, and 5)
2. Understand the function of specific genes, microRNAs or (stem) cells in **pathological remodeling** under basal and stress conditions by looking at their effect on fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy (Animal Procedures 1, 2, 3, 4, and 6)
3. Understand the influence of specific drug compounds, microRNA therapeutics or exercise on **heart regeneration** and **remodeling** by looking at the effect of cell death, proliferation, differentiation, fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy (Animal Procedures 1- 6)
4. Can we enhance cardiac delivery of therapeutic compounds? (Animal Procedures 2-6)

There are several reasons why we think that we can achieve our aims:

All required techniques (except for one – the transplantation of cells or their derivatives in mice) are currently being performed in our lab under the appropriate DEC protocols. A summary of the currently ongoing studies, approved by the DEC and that will be part of this project after the license is obtained, is listed in **Appendix II**. Most of the Animal Procedures as described in Appendices 1-6 are currently being performed and are part of the ongoing projects.

Work from our group on heart regeneration and pathological remodeling has resulted in seminal papers that described the required techniques and even resulted in the foundation of miRagen therapeutics, a biotechnology company focused on the development of microRNA based therapies, of which I am a founder (**Appendix I**).

Our research and experiments are continuously being evaluated by our group and by various other groups within our institute. Moreover, our research is positively judged by national and international funding agencies including the ERC and the Hartstichting. Our group is also a member of a Leducq consortium, which is a prominent cardiovascular research network of seven research institutions in both Europe and the US. Our ambition is to significantly improve life expectancy and quality of life for patients suffering from heart disease and to provide multidisciplinary training for the next generation of cardiac researchers and specialists. The scientists working in our group are selected based on their excellence and their commitment to the mission of the program.

Over the last few years, we have built up a repertoire of genetic and surgical models that allow us to determine the functional and molecular effects of cardiac remodeling, disease and therapeutic interventions. Our embedding in an excellent scientific environment, our expertise in cardiac remodeling, disease and mouse genetics, unique techniques and approaches, and our previous achievement makes it very likely that with the experiments described in this project we will make large contributions to our main research questions.

Our group is embedded in the Hubrecht Institute, which is a center-of-excellence on developmental biology, and stem cell and cancer research. The Hubrecht Institute provides core facilities for various high-end techniques such as deep sequencing, histology, fluorescent imaging, mRNA expression array, and flow cytometry. Moreover, the Hubrecht Institute has just renovated their animal facility, and now it can compete with the best animal facilities that can be found internationally. Dedicated staff takes care of regular housing of the animals and support the scientist in their experiments. Within our group, we

have two dedicated in vivo technicians and very experienced scientists that oversee the breeding of all mouse lines, experiments and procedures, and new people are trained when required. This guarantees that only experienced people perform experiments.

3.3 Relevance

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

Heart disease is a modern world epidemic for which there currently are no effective therapies that could stop - let alone reverse- disease progression with the exception of heart transplantation or assist devices. Unfortunately, these treatment options are only available to a minute fraction of the population in need of treatment due to donor scarcity, and are accompanied by incredibly high costs. Given the global burden of heart disease and its increasing prevalence, the development of novel regenerative approaches is of the utmost importance.

Our lab has unveiled mechanism by which we can enhance heart regeneration and/or block pathological remodeling. We have an ongoing sponsored research agreement with miRagen Therapeutics, a biotechnology company focused on the development of microRNA based therapies, of which I am a founder and special advisor. The enthusiasm for developing new therapeutics for heart disease is further underscored by the \$352M partnership between miRagen and Servier for Research development and commercialization of microRNA-targeting drugs for cardiovascular disease (<http://www.miragentherapeutics.com/4/News/>).

This is a clear example of how fundamental discoveries can help to better understand biology and thereby support the development of better therapies for patients that are suffering from heart disease to improve their quality of life.

3.4 Research strategy

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

1. Workflow of experiments:

See flow charts in attachment 1

Based on data generated in previous and ongoing studies, available literature, interactions with other scientists and preliminary data, we generate a hypothesis about a molecular and/or cellular mechanism that can contribute to cardiac regeneration and remodeling. The identified hypothesis surrounding the function of a gene, microRNA or cell type in aspects of heart disease (cardiomyocyte renewal, hypertrophy or fibrosis) will initially be carefully tested in tissues from previous cardiac stress studies, human heart samples and cell lines, including neonatal rat cardiomyocytes. **The specific hypotheses we are working on at present are listed in Appendix II**, but new hypothesis are constantly added and will be tested using the same approaches.

Once our preliminary tests on available material provides enough support for our original hypothesis or research question, we will consider the extensive and careful analysis of the mechanism in wildtype or GM mice. For our in vivo experiments we will use wildtype, GM mice or mice in which a gene or microRNA has been modified with a compound or a virus. If the desired genotype is not available we will create the mouse line ourselves. We will only use well-established reagents and protocols to induce expression or deletion of the candidate gene/s. Our considerations and findings that support the use of mice will be part of our application that we submit to the IvD. In the rare occasion that genetic interventions that modulate our gene, microRNA or cell type of interest induce a phenotype under baseline conditions, we will not expose these mice to any additional cardiac stresses like myocardial infarction or transverse aortic banding.

Once we decide our hypothesis is supported enough to pursue a gene, microRNA or cell type using animal experiments (go/no go), we will first set up a pilot studies with the minimum amount of animals possible to test the validity of our research question in vivo. For every experiment, we design the experiment with clear go-no-go decisions, to reduce the amount of cumulative discomfort and/or the number of animals. For every experiment, the best trade-off will be made. For example: based on elaborate time-response studies, we have RNA material from cardiac tissue available at many different time points after myocardial infarction or transverse aortic banding. This material should help us to identify the time point at which it is most logical for a gene, microRNA or cell type to be relevant for either cardiac repair or pathological remodeling. Based on these data we will perform a pilot study in the appropriate mouse lines and collect tissue at the time when this gene, microRNA or cell type should have the greatest effect. In case we do not observe an effect, we will go back to our original hypothesis and

determine what might explain the lack of effect, before we move forward with a second pilot experiment. Depending on the result of this second experiment we might opt to not further investigate the function of the gene, microRNA or cell type under the stress conditions tested (go/no go).

We might consider a therapeutic intervention only after we validate that the pathway our compound or microRNA-therapeutic is involved in is activated in the hearts of the mice that we are studying. We can test this by exploring either historical sample sets or by testing samples obtained from pilot studies. Only if we are able to confirm the activation of a certain pathway relevant to our compound or microRNA, we will test the therapeutic effect of intervening with the activation of this pathway (go/no go). Swimming-induced exercise might have a beneficial effect on heart repair and regeneration and the effect will therefore only be tested in unstressed mice or mice that received an MI or IR).

2. Strategy in relation to the main scientific research questions

To answer our **research question 1** regarding the function of a gene, microRNA or specific cell type in **heart regeneration**, we can use mice in which a gene, microRNA or (stem) cell component has been modified after which we expose the animals to no intervention or ischemic injury (MI or IR) (Animal Procedures 2, 3, 4 and 5). The readout will be an effect on cardiac function and cell death, proliferation and differentiation.

To answer our **research question 2** regarding the function of a gene, microRNA or specific cell type in **pathological remodeling**, we can use mice in which a gene, microRNA or (stem) cell component has been modified after which we expose the animals to no intervention or a stress that induced pathological remodeling (TAB, high-salt diet, remodeling agent, high-fat diet or exercise) (Animal Procedures 2, 3, 4, and 6). The choice of stress depends on the specific research questions and the proposed function of the gene or microRNA that is being studied. The readout will be an effect on cardiac function, hypertrophy and fibrosis.

To answer our **research question 3** in vivo we will study the effect of drug, microRNA therapeutic or swimming in mice that received no intervention or mice that were exposed to ischemic injury or a stress driving pathological remodeling (Animal Procedures 2, 3, 4, 5, and 6). The readout will be an effect on cardiac function, cell death, proliferation, differentiation, fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy.

To answer our **research question 4** regarding cardiac delivery of therapeutic agents in vivo, we will study the effect of using different delivery vehicles (like hydrogel) to enhance cardiac delivery of compounds or microRNA therapeutics. This will be done in mice that received no intervention or mice that were exposed to ischemic injury or a stress driving pathological remodeling (Animal Procedures 2, 3, 4, 5, and 6). The readout will be an effect on cardiac function, cell death, proliferation, differentiation, fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy.

3. In planning our studies we base our experimental design on the following choices:

- In vitro experiments using rat neonatal cardiomyocytes:

To test a research hypothesis in vitro we will in some cases isolate neonatal rat cardiomyocytes. These primary cells are collected from neonatal rats and provide a much used model system for studying heart muscle cell biology. We can only use neonatal cells since adult heart muscle cells cannot be taken in culture. This procedure is routinely carried out in our lab.

- Mouse model (indicated on flowchart with A):

To test a research hypothesis in vivo we will use an appropriate mouse model. This can be done in wild type mice, genetically modified mice, or mice in which gene or microRNA levels have been modulated in vivo by a virus (adeno associated virus or lentivirus). In some cases we might need to use mice that got transplanted with cells to study the in vivo effect of specific cells or cellular derivatives.

Considerations for choosing a mouse model:

- Wild type mouse
Wild type mice will be used if we want to study the effect of myocardial infarction or a different pathological stress in the absence or presence of a therapeutic intervention.
- GMM
- Genetically modified mice will be used to study the cardiac function of a specific gene, microRNA or type of (stem) cell. In case a mouse line with the required genetic modification is not available we will generate new mouse line via standard oocyte injection, blastocyst injection, or via the CRISPR/Cas9 system (outlined in **animal procedure 3.4.4.2**)

- Mouse injected with virus to increase or inhibit a gene or microRNA

In case genetic approaches fail to provide appropriate mouse lines, we will revert to viral vectors to increase or inhibit a gene or microRNA by systemic dosing. Viral vectors can also be used to manipulate a gene or microRNA more locally via intracardiac injection

- Wild type mice or GMM transplanted with cells or derivatives

In case we want to study the cardiac effect of cell-based treatments, we will transplant (stem) cells or their derivatives in either wild type or genetically modified mice.

- Cardiac stress / induction of heart disease (indicated on flowchart with B):

We can choose to study these mice under basal conditions or under conditions of cardiac stress (like myocardial infarction or pathological stress). Considerations for choosing a cardiac stress:

- No intervention

Mouse lines will receive no intervention in case we want to study the cardiac function of a gene, microRNA or (stem) cell under basal conditions.

- Myocardial infarction (MI or IR)

Mice will receive a myocardial infarction (permanent occlusion (MI or ischemia followed by reperfusion (IR)) when we want to study the function of a gene, microRNA or (stem) cell in cardiac repair / regeneration.

- Pathological stress to induce remodeling (TAB, high-salt diet, remodeling agent, high-fat diet, exercise to trigger disease)

Mice will receive a pathological stress when we want to study the function of a gene, microRNA or (stem) cell in pathological remodeling. The differences between the different stress models are explained in section **3.1** and our choice between the different model will depend on the specific research aim.

- Intervention (indicated on flowchart with C):

After introducing a cardiac stress or leaving the animals untreated, we can opt to study the effect of a therapeutic intervention either by the delivery of a compound

- No intervention

Mouse lines will receive no intervention in case we want to study the cardiac function of a gene, microRNA or (stem) cell under basal conditions.

- Deliver a drug compound or microRNA therapeutic

- Exercise for cardioprotection.

- Readouts /endpoint (indicated on flowchart with D)

- Cardiac function
- Behavior
- Ex vivo analysis of cells and tissues

To study the molecular and/or cellular mechanisms of cardiac regeneration and remodeling, we need to analyze tissues and cells from the mice ex vivo to perform cellular, molecular and histological analysis.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

The specific protocols that we apply to achieve our research goals are outlined below. All these Animal Procedures and their components are currently already ongoing in our lab, with the exception of transplanting cells or their derivatives to study their function in heart disease.

1. Isolation of neonatal rat cardiomyocytes (described in detail in 3.4.4.1)

To study aspects of regeneration or remodeling in vitro we will isolate neonatal rat cardiomyocytes. These primary cells will be collected from neonatal rats and provide a much used model system for studying heart muscle cell biology.

2. Generation of genetically modified mice (described in detail in 3.4.4.2)

To study the function or behavior of a gene or a cell type relevant for cardiac we will use appropriate mouse lines that are either already available or that need to be generated. New mouse line(s) will be generated via standard oocyte injection, blastocyst injection, or via the CRISPR/Cas9 system. The CRISPR/Cas9 system will especially be used as highly efficient tool for simultaneously multi-gene editing.

This prevents the generation and breeding of multiple homozygotes from individually targeted ES cells (Reduction of the 3Rs).

In contrast to conventional gene-targeting strategy, the use of the Cre/LoxP recombination system in conjunction with gene targeting allows us study the consequence of gene manipulation in a cell type specific manner. By incorporating Cre recombinase recognition sites (LoxP) into the genome, Cre expression from a specific promoter can drive gene disruption, activation or tracing in a cell type specific manner. New transgenic lines and/or KO lines generated via classical methods and/or novel combinations and used for breeding of these aforementioned lines will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence of constitutional discomfort.

Cre recombinase expression can also be activated in an inducible manner by the addition of tamoxifen. To this end the Cre is flanked by 2 mutated estrogen receptors (Creert2, or merCremer) and will only allow for Cre activation when tamoxifen is administered.

3. Collecting (stem) cells or tissue for ex vivo experiments (described in detail in 3.4.4.3)

In case we only collect cells or tissues for ex vivo experiments we will use wild type or genetically modified mice without any further intervention. In some cases we might need to use mice that received a cellular transplant to study the in vivo effect of specific cells or cellular derivatives.

4. Study the effect of drug delivery or exercise in mouse model under basal conditions (described in detail in 3.4.4.4)

To study the cardiac function of a gene, microRNA or (stem) cell under **basal conditions**, the appropriate mouse line will be left untreated (no intervention). These mouse models can be used in studies without further intervention or we add an additional therapeutic intervention (drug or exercise) to determine the effect on heart function, behavior or molecular readouts.

5. Study the function of a gene, microRNA or specific cell type in heart regeneration by using a model for myocardial infarction (MI or ischemia reperfusion (IR) (described in detail in 3.4.4.5).

In case we want to study the function of a gene, microRNA or specific cell type in **heart regeneration**, we can use mice in which a gene, microRNA or (stem) cell component has been modified after which we expose the animals to ischemic injury (MI or IR). These mouse models can be used in studies without further intervention or we add an additional therapeutic intervention (drug or exercise) to determine the effect on heart function, behavior or molecular readouts.

6. Study the function of a gene, microRNA or specific cell type in heart remodeling by using a model for pathological remodeling (described in detail in 3.4.4.6).

In case we want to study the function of a gene, microRNA or specific cell type in **pathological remodeling**, we can use mice in which a gene, microRNA or (stem) cell component has been modified after which we expose the animals to a stress that induces a pathological remodeling response. These mouse models can be used in studies without further intervention or we add an additional therapeutic intervention (drug or exercise) to determine the effect on heart function, behavior or molecular readouts.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

See Flow Chart in attachment 1.

All experiments start with the identification of a candidate gene, microRNA or cell type. The identified gene, microRNA or cell type will initially be carefully tested in tissues from previous cardiac stress studies, human heart samples and cell lines, including neonatal rat cardiomyocytes (**3.4.4.1**). If the identified gene, microRNA or cell type shows an interesting phenotype in these in samples / in vitro experiments, we will consider the extensive and careful analysis of (compound) GM mice. For our in vivo experiments we will use genetically modified mice. If the desired genotype is not available we will create them ourselves. We will only use well-established reagents and protocols to induce expression or deletion of the candidate gene/s (**3.4.4.2**).

Whenever possible, for all our in vivo experiments we will perform a pilot studies with the minimum amount of animals possible. For every experiment, we design the experiment with clear go-no-go decisions, to reduce the amount of cumulative discomfort and/or the number of animals. For every experiment, the best trade-off will be made. See section 3.4.1 for a more detailed workflow.

In some cases we will use our mouse lines without any further intervention for the collection of tissues or cells for ex vivo analysis (3.4.4.3).

Our mice will either receive no intervention (3.4.4.4), a stress to study regeneration (3.4.4.5) or a stress to study pathological remodeling (3.4.4.6). Per mouse line we might switch between these 3 options, depending on the condition we want to study the function of a gene, microRNA or cell type under. Since the process of regeneration and repair also involves aspects of cardiac remodeling we will want to expose most of our genetic mouse models to both kind of stresses to study the exact function in the different aspects of heart disease.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Isolation of neonatal rat cardiomyocytes
2	Generation, welfare assessment and breeding genetically modified mice (GMM)
3	Collecting (stem) cells or tissue for ex vivo experiments
4	Drug delivery or exercise
5	Myocardial infarction / Ischemia reperfusion
6	Models for cardiac pathological remodeling
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3.4.4.1	Type of animal procedure Isolation of neonatal rat cardiomyocytes

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (3.4.4.1).

In some cases we will use cardiomyocytes in an attempt to validate a research hypothesis. The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart. The rat is the most validated species to obtain cardiomyocytes from and give the biggest yield. Neonatal hearts are isolated because neonatal cardiomyocytes can be kept in culture longer and better than adult cardiomyocytes. This procedure is standardized and well validated in many different labs and the applicant as well as lab members are familiar with the isolation technique.

Pregnant rats will be used to deliver the pups required for the neonatal rats. From these pups cardiac tissue will be collected for the isolation of primary cardiomyocytes between postnatal day 1-4.

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

Animal procedure in rats

- Pregnant female rats ordered from an establishment licensed breeder by the NVWA or from a registered commercial company and delivered around E11 of their pregnancy.
- Heart cells of neonatal rat pups (P1-P4) will be collected for cell culture.
- Pups will be removed from their mother's cage and sedated by hypothermia before sacrifice after

- which the heart will be collected.
- The females (mothers) will be euthanized by O₂/CO₂ method.

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of cells to be required for an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis is based on literature and/or on years of experience with similar type of experiments. Moreover, the in vitro experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of rats per group needed to get a conclusive result.

B. The animals

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

Rat wildtype

Age; adult (mothers), pups (P1-P4)

Origin; external licensed breeders

Number of animals: 360 pregnant rats, 2700 pups

To perform in vitro experiments in cardiomyocytes we need to isolate primary neonatal rat ventricular cardiomyocytes. Rat is the most validated species to obtain these cells from and give the biggest yield. Neonatal hearts are isolated because neonatal cardiomyocytes can be kept in culture longer and better than adult cardiomyocytes. This procedure is standardized and well validated in many different labs and the applicant as well as lab members are familiar with the isolation technique.

We will analyze the effect of modulating our gene, factor or microRNA of interest, in cardiomyocytes. Based on our experience during the last 2 years we expect to isolate neonatal rat cardiomyocytes once every 3 weeks (= 18 x per year * 5 years = 90 isolations). This is to keep a continuous supply of cells for continuity and reproducibility of the results.

We isolate cardiomyocyte cells from 25-30 neonatal rat pups per isolation. The number of pups and expected yield is based on years of experience with working with these cells.

4 (pregnant rats) * 90 (isolations) = maximum of **360** pregnant rats

30 (pups) * 90 (isolations) = maximum **2700** neonatal rat pups

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

The experiments described in this protocol allow us to perform in vitro testing of our hypothesis in an

appropriate cells line. For some projects, using this cell line will enable us to assess whether there is enough support to consider the import or generation and subsequently analysis of GGM to study the function of a gene or microRNA in the heart. The use of in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum. Based on our experience, cardiomyocyte-like cells (like HL-1 cells) do not provide reliable data regarding a biological function in true cardiomyocytes, so there is no good alternative using no experimental animals for these types of in vitro experiments.

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

Appropriate possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all rats will be housed under strict D1 conditions.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

- Pups will be removed from their mother's cage and placed on melting ice (but not in direct

contact with).

- After sedation by hypothermia pups will be sacrificed by decapitation after which the heart will be collected.
- Heads will immediately be put in liquid nitrogen.
- The mothers will be will be euthanized by O2/CO2 method.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

none

Explain why these effects may emerge.

-

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

-

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Mothers: mild discomfort 100%

Pups: mild discomfort 100%

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The mother rats will be sacrificed to prevent discomfort from removing her litter and the pups will be sacrificed to collect cardiomyocytes for in vitro experiments.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.2	Generation, welfare assessment and breeding genetically modified mice (GMM)

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (3.4.4.2).

Generate new mouse lines by injecting DNA/RNA into oocyte, injection of genetically modified ES cells into blastocysts and/or via the CRISPR/Cas9 system. The CRISPR/Cas9 system will especially be used as a highly efficient tool for simultaneously multi-gene editing. We will do zygote injections with Cas9 and sgRNA to create a genetic deletions or zygote injection with Cas9, sgRNA and DNA template to create a knock in mice.

Welfare assessment according to the Consensus documents on genetically altered animals. New compound mouse models and new created transgenic lines and/or KO lines generated via classical methods and/or novel combinations of these aforementioned lines will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence a phenotype with constitutional discomfort. We will daily check the mice on several parameters like overall appearance, size, growth, coat conditions, behaviour and clinical signs.

We breed our own transgenic and knock out mouse lines. In some mouse lines we make use of the Cre/Loxp recombination system. For that we had to cross transgenic or knock out mouse lines, who are caring LoxP site in there genome, with a Cre or tamoxifen inducible Cre mouse line. We have 3-8 breeding pairs per mouse line that will be retain for a maximum of 6 month. The offspring will be used for experiments.

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

Generation new lines

1. Superovulation; Administration of gonadotropin's (2x) in female mice by subcutaneous or intraperitoneal injections followed by mating. Females will be killed for the isolation of early embryos.
2. Embryo recipients; Recipients for embryo transfer will be rendered pseudo-pregnant by mating with a sterile (vasectomized) male. Genetically modified embryos will be implanted surgically or non-surgically into the reproductive tract. Embryo recipients, not as part of an experiment, will be killed after weaning of the pups at three weeks of age.
3. Weaned pups at 3 weeks of age; tissue sampling for genotyping and/or identification via tail, toe and ear cut, respectively, under isoflurane anesthesia.

Welfare assessment

We will daily check the mice on several parameters (overall appearance, size, growth, coat conditions, behaviour, clinical signs, relative size and numbers) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013.

Breeding genetically modified mice

Mice will be housed under normal conditions with free access to food and water. Start breeding with a minimum of 8 weeks old mice. Breeding will be retaining for a maximum of 6 months. Depending on the amount of experimental animals, 3-10 breeding pairs per genotype will be needed.

Killing animals

In case of discomfort or surplus animals (mice who don't have the right genotype), animals will be euthanized by O₂/CO₂ method or by isoflurane and will be confirmed by cervical dislocation.

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

Statistical analysis doesn't play a role for these type of experiments. We will use state of art techniques. All techniques are proven to be effective in generating genetic modified mice with a minimum number of mice possible.

B. The animals

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

Mus musculus; WT or genetically modified

Age; adult

Origin; All vasectomized males which will be obtained from a registered commercial company, all other mice are obtained from our own Institute, an establishment licensed breeder by the NWWA, or from a registered commercial company.

Generation of genetic modified mice; We expect to generate a maximum of 40 new mouse lines over the next 5 years. For the creation of new mouse line we will use on average max 150 mice (according to the 'besluit biotechnologie'). Therefore, a total of max 150 (mice) x 40 (mouse lines) = **6000** mice is requested.

Welfare assessment;

We expect to generate over the next 5 years 40 new genetically modified lines for which we have to perform the welfare assessment for 2 generations. We therefore need in total: 40 (new (compound) lines) * 2 (generations) * 32((8 male +8 female =16 GM mice) + (8 male +8 female = 16 control mice))= 2560 mice.

These 40 lines will on average be bred to 3 other different lines for 2 generations (in general this will entail breeding with different Cre lines to specifically manipulate a gene or microRNA or cells type). We therefore need in total: 40 (new (compound) lines) * 3 (lines) * 2 (generations) * 32((8 male +8 female

=16 genotype 1) + (8 male +8 female = genotype 2)) = 7680 mice.
Total number for welfare assessment is **10.240** mice

The offspring of these breeding pairs will be used in appendix 3.4.4.3 t/m 3.4.4.6. The number of animals are described in these appendixes.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Before we consider the generation of a new (compound) GM mice we first will extensively analyze in samples from previous in vivo studies, human cardiac samples that are available or we will use in vitro experiments to determine whether our research hypothesis is valid. Only if the tissue analysis and/or in vitro experiments are insufficient to completely address the research question/hypothesis, we will consider the generation of a novel genetically modified mice.

The CRISPR/Cas9 system allows us, if required, to genetically modify up to 5 different genes at the same time. This strongly reduce the number of mice used for the generation and/or breeding of these compound mice.

Since we are dealing with complex systems where all different cell types contribute to the outcome, it is not possible to appropriately study heart biology without using animals.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

If required, isoflurane and/or a mixture of ketamine and xylazine will be used for general anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Some of the animal lines might experience discomfort under basal conditions due to the genetic modification of a gene or microRNA. This is expected in less than 5% of the animal lines that are being studied.

Explain why these effects may emerge.

These effects might occur due to genetic modification of a gene or microRNA

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort.

Indicate the likely incidence.

Expected in <5% of the new lines generated.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Donors: Moderate 100%

Fosters: Moderate 100%

Genetically modified mice: 100% moderate. This is likely an overestimation of the discomfort, but

Welfare assessment: Mild 100%
the true discomfort will be assessed for each individual experiment.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Animals are no longer needed anymore (surplus or fosters) or animals are killed

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.3	Collecting (stem) cells or tissue for ex vivo experiments

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (3.4.4.3).

Animal model (indicated on flowchart with A):

To test a research hypothesis we will use wild type mice, genetically modified mice, or mice in which a specific gene or microRNA level has been modulated in vivo by a virus (such as adeno associated virus or lentivirus).

Considerations for choosing a mouse model:

- Wild type mouse
Wild type mice will be used if we need normal tissues or cells to study our research hypothesis.
- GMM
Genetically modified mice will be used to study the cardiac function of a specific gene, microRNA or type of (stem) cell. In case a mouse line with the required genetic modification is not available we will generate new mouse line via standard oocyte injection, blastocyst injection, or via the CRISPR/Cas9 system (outlined in Appendix 3.4.4.2)
- Mouse injected with virus to increase or inhibit a gene or microRNA
In case genetic approaches fail to provide appropriate mouse lines, we will revert to viral vectors to increase or inhibit a gene or microRNA by systemic dosing. Viral vectors can also be used to manipulate a gene or microRNA more locally via intracardiac injection.

Cardiac stress (indicated on flowchart with B):

- No intervention

Readout parameters /endpoint (indicated on flowchart with D):

- Ex vivo analysis of cells and tissues

To study the molecular and/or cellular mechanisms of the heart, we need to analyze tissues and cells from mice ex vivo. In some cases we will need to collect cells with a certain genetic constitution to transplant back into wildtype or genetically modified mice.

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

Animal model (indicated on flowchart with A):

- Mice are ordered from a commercial NVMA licensed breeder or from a registered commercial company, or are generated by ourselves under protocol 3.4.4.2.
- Tissue sampling for genotyping and identification will be done via ear, toe and/or tail biopsy carried out under anaesthesia (4% (isoflurane/oxygen)).
- In some cases we will administer transgene inducing or deleting agents alone or in combination, continuously or intermittently by one or maximally 2 of the following routes:
 - o in diet or drinking water (max. 1 time, < 2 wks)
 - o subcutaneous injection (max. 3 times)
 - o intraperitoneal injection (max. 7 times)
 - o implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia
 - o implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia
 - o oral (max. 10 times)
- In some cases we will inject a virus or microRNA therapeutic by one or maximally 2 of the following routes:
 - o Intravenous injection (max. 10 times)
 - o Subcutaneous injection (max. 10 times)
 - o Intraperitoneal injection (max. 10 times)
- In some cases WT or GM mice will be transplanted with cells under adequate anaesthesia and analgesia.
-

Readouts /endpoint (indicated on flowchart with D)

- Ex vivo analysis of cells and tissues

All animals will be killed for ex vivo analysis or use of cells and or tissues.

Adult mice will be killed via CO2/O2 method, via cervical dislocation under isoflurane anesthesia, or via perfusion fixation under lethal dose of Nembutal.

Neonates (< 4 days) will be put on melting ice water for 10 min. (but not in contact with) after which they will be decapitated and the head immediately frozen.

Tissue will be collected for histological and molecular analysis to look at aspects of cell size, survival, proliferation, differentiation, hypertrophy or fibrosis.

The cumulative discomfort in the genetic models will maximally consist of discomfort due to:

- the genetic modification (< 5% of lines)
- tissue sampling for genotyping
- maximally 2 routes of administration of transgene inducing or deleting agents
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- sacrifice

The cumulative discomfort in the models injected with a virus or microRNA therapeutic will maximally consist of discomfort due to:

- inject a virus or microRNA therapeutic by maximally 2 routes of administration
 - sacrifice
-

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group needed that will be informative.

B. The animals

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

Mus musculus; WT, genetically modified or injected with a virus or microRNA therapeutic
Age; neonates p1-p4 and adults
Origin; Hubrecht institute or external licensed breeders
Number of animals: 4800

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand how the heart functions as an organ and how it remodels during disease. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

To study the effect of increasing or deleting a gene or microRNA on the heart, on average we use 20 mice per genotype that we want to study (which is usually WT and GM mice). Based on our experience we will maximally analyze 40 different mouse lines over the next 5 years and we will study these mice at different time points (3 time points on average).

Since cardiac biology and pathology is really different in males and females because of estrogen signaling in females we only use males in our functional studies to exclude gender based variation (see also project proposal).

The maximum required number of animals. $20 * 2$ (WT and GM mice) $* 3$ (different time points) $* 40$ (mouse lines) = **4800 male mice**

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research

strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Before we consider the import or generation and subsequently analysis of GGM to study the function of a gene or microRNA in the heart, we first will analyze appropriate cell lines, existing patient material or materials available from previous animal studies, which extensively reduces the animal numbers. The use of human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum. Also trying to use the newly developed CRISPR/Cas9 method to create new mouse lines will significantly reduce the number of animals needed to generate a new line.

However, animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms in cardiac biology and disease. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible. Experiments will be done sequentially, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice do not show any discomfort we will keep the mice on a homozygous background for breeding, thereby reducing the number of mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 and/or D2 conditions.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

If required, adequate anesthesia and analgesia will be used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Some of the animal lines might experience discomfort under basal conditions due to the genetic modification of a gene or microRNA. This is expected in less than 5% of the animal lines that are being studied.

Explain why these effects may emerge.

These effects might occur due to genetic modification of a gene or microRNA

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals. If we unexpectedly observed weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort animals will be taken out of experiment and sacrificed.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort.

Indicate the likely incidence.

Expected in <5% of the new lines generated

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The cumulative discomfort in the genetic models will maximally consist of moderate discomfort due to:

- the genetic modification (< 5% of lines)
- tissue sampling for genotyping
- maximally 2 routes of administration of transgene inducing or deleting agents
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- sacrifice

The cumulative discomfort in the models injected with a virus or microRNA therapeutic will maximally consist of moderate discomfort due to:

- inject a virus or microRNA therapeutic by maximally 2 routes of administration
- sacrifice

Neonatal mice: 100% moderate. This is likely an overestimation of the discomfort, but the true discomfort will be assessed for each individual experiment.

Adult mice: 100% moderate. This is likely an overestimation of the discomfort, but the true discomfort will be assessed for each individual experiment.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

All animals are killed to use their organs for ex vivo analysis

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3.4.4.4	Type of animal procedure Drug delivery or exercise

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (3.4.4.4).

To study the cardiac function of a gene, microRNA or (stem) cell under **in the absence of cardiac stress conditions**, the appropriate mouse line will be left untreated (no intervention). These mouse models can be used in studies without further intervention or we add an additional therapeutic intervention (drug or exercise) to determine the effect on heart function, behavior or molecular read outs

The different components of the proposed experiments are:

Mouse model (indicated on flowchart with A):

To test a research hypothesis in vivo we will use an appropriate mouse model. This can be done in wild type mice, genetically modified mice, or mice in which gene or microRNA levels have been modulated in vivo by a virus (such as adeno associated virus or lentivirus). In some cases we might need to use mice that got transplanted with cells to study the in vivo effect of specific cells or cellular derivatives.

Considerations for choosing a mouse model:

- Wild type mouse

Wild type mice will be used if we want to study the effect a therapeutic intervention.

- GMM

Genetically modified mice will be used to study the cardiac function of a specific gene, microRNA or type of (stem) cell. In case a mouse line with the required genetic modification is not available

we will generate new mouse line via standard oocyte injection, blastocyst injection, or via the CRISPR/Cas9 system (outlined in Appendix 3.4.4.2)

- Mouse injected with virus to increase or inhibit a gene or microRNA

In case genetic approaches fail to provide appropriate mouse lines, we will revert to viral vectors to increase or inhibit a gene or microRNA. This can also serve to manipulate a gene or microRNA more locally via intracardiac injection

- Wild type mice or GMM transplanted with cells or derivatives

In case we want to study the cardiac effect of cell-based treatments, we will transplant (stem) cells or derivatives in either wild type or genetically modified mice.

Cardiac stress (indicated on flowchart with B):

- No intervention

Mouse lines will receive no intervention in case we want to study the cardiac function of a gene, microRNA or (stem) cell under basal conditions.

Intervention (indicated on flowchart with C):

- No intervention

Mouse lines will receive no intervention in case we want to study the cardiac function of a gene, microRNA or (stem) cell under basal conditions.

- Deliver a drug compound

- Exercise

Readouts /endpoint (indicated on flowchart with D)

- Cardiac function (by for example echocardiography or pressure catheters)

- Behavior

- Ex vivo analysis of cells and tissues

In all experiments, we will determine cardiac function and determine the general behavior of the animals. All mice will be sacrificed for detailed analysis of the heart and other tissues involved in aspects of heart disease (lungs, kidneys, liver). Analysis will include histology and molecular analysis. Also, cells from organs might be isolated by FACS for subsequent analysis.

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

Animal model (indicated on flowchart with A):

- Mice are ordered from a commercial, NVWA licensed breeder or from a registered commercial company, or are generated by ourselves under protocol 3.4.4.2.
- Tissue sampling for genotyping and identification will be done via ear, toe and/or tail biopsy under anaesthesia (4% (isoflurane/oxygen)).
- In some cases we will administer transgene inducing or deleting agents alone or in combination, continuously or intermittently by one or maximally 2 of the following routes:
 - o in diet or drinking water (max. 1 time, < 2 wks)
 - o subcutaneous injection (max. 3 times)
 - o intraperitoneal injection (max. 7 times)
 - o implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia
 - o implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia
 - o oral (max. 10 times)
- In some cases we will inject a virus or microRNA therapeutic by one or maximally 2 of the following routes:
 - o Intravenous injection (max. 10 times)
 - o Subcutaneous injection (max. 10 times)
 - o Intraperitoneal injection (max. 10 times)
- In some cases WT or GM mice will be transplanted with cells under adequate anaesthesia and analgesia

- In some cases we will administer a labelling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:
 - o intraperitoneal injection (1 time)
 - o implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - o intravenous injection (1 time)

Intervention (indicated on flowchart with C):

- No intervention
- Deliver a drug compound
 - o Systemic delivery of compound or microRNA therapeutic by
 - Subcutaneous injection once weekly or every two weeks for maximally 12 weeks
 - intraperitoneal injection once weekly or every two weeks for maximally 12 weeks
 - implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - o Intracardiac delivery of compound or microRNA therapeutic
 - Mice will be anesthetized with appropriate anesthesia.
 - Hair will be removed from the ventral surface of the neck and thorax
 - A tracheal tube will be placed and the mouse connected to a ventilator
 - A surgical plane of anesthesia as judged by lack of pain reflex (toe pinch)
 - The surgical site will be cleaned with iodine and 70% ethanol.
 - Using aseptic technique with sterile instruments, the skin will be incised left of midline to allow access to the third intercostal space. Pectoral muscles will be retracted and the intercostal muscles cut caudal to the third rib. A rib spreader will be placed to allow access to the heart.
 - Drug or microRNA therapeutic compound will be delivered via intracardiac injection.
 - The rib cage will be closed with a suture and the skin closed with tissue adhesive.
 - The animal will be disconnected from the ventilator the tracheal tube removed and the animal placed unrestrained on a nose cone with 100% oxygen in a warm recovery cage until fully ambulatory, at which point the oxygen will be turned off
- Exercise

Swimming exercise starting with 10 minutes 2 times daily with 10 minutes increase each day until 90 minutes, 2 times per day is reached. The 2 x 90 minutes a day will continue for 2 to max 10 weeks (depending on how long it takes to observe cardiac remodeling by echo). The mice will be observed at all times to avoid mice submerging under the water surface.

Readouts /endpoint (indicated on flowchart with D)

- Cardiac function

Cardiac function will be evaluated by echocardiography, ECG, or pressure catheters on sedated, adult mice
- Behavior

Animals will be monitored for general signs of sickness and/or discomfort by looking for immobility, significant weight loss or lack of grooming and/or symptoms of heart failure (like dyspnoea and edema). If these signs are unexpectedly observed the animals will be euthanized prematurely
- Ex vivo analysis of cells and tissues

Tissue will be collected for histological and molecular analysis to look at aspects of cell size, survival, proliferation, differentiation, hypertrophy or fibrosis.

The choice of intervention depends on the specific research questions and the proposed function of the gene or microRNA that is being studied.

The cumulative discomfort in the genetic models will maximally consist of discomfort due to:

- the genetic modification (< 5% of lines)

- tissue sampling for genotyping
- maximally 2 routes of administration of transgene inducing or deleting agents
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

The cumulative discomfort in the models injected with a virus or microRNA therapeutic will maximally consist of discomfort due to:

- inject a virus or microRNA therapeutic by maximally 2 routes of administration
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments.

Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Mus musculus; WT, genetically modified or injected with a virus or microRNA therapeutic

Age; neonates p1-p4 and adults

Origin; Hubrecht institute or external licensed breeders

Number of animals: 3200 male mice

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand tissue development/homeostasis and cancer in the context of the whole organism. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

For the type of experiments described in this procedure, it is difficult to calculate the exact number of animals, since for various experimental setups require different numbers of mice, and the variation and outcome of the experiments are unknown. The number of mice required depends on the intervention (e.g no intervention, drug or microRNA therapeutic delivery or exercise), and the goal of the experiment. For these reasons we have provided a total number of mice based on experience over the past 5 years with these types of experiments in our group. Before we will start an experiment we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe which considerations, facts and results have led to the proposition of the number of animals needed for these experiments.

To study the effect on the heart of no intervention, drug or microRNA therapeutic delivery or exercise after increasing or deleting a gene or microRNA we use on average 20 mice per genotype that we want to study (which is usually WT and GMM). We want to study the effect of either no intervention, drug or microRNA therapeutic delivery or exercise on mouse lines used in our lab. We expect to generate a

maximum of 40 new mouse lines over the next 5 years and each mouse line to receive around 2 interventions.

Since cardiac biology and pathology is really different in males and females because of estrogen signaling in females we only use males in our functional studies to exclude gender based variation.

The maximum required number of animals. 20×2 (WT and GM mice) * 2 (different interventions) * 40 (mouse lines) = **3200 male mice**

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Before we consider the import or generation and subsequently analysis of GGM to study the function of a gene or microRNA in the heart, we first will analyze appropriate cell lines, existing patient material or materials available from previous animal studies, which extensively reduces the animal numbers. The use human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum. Also trying to use the newly developed CRISPR/Cas9 method to create new mouse lines will significantly reduce the number of animals needed to generate a new line.

However, animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms in cardiac biology and disease. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible. Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice do not show any discomfort we will keep the mice on a homozygous background for breeding, thereby reducing the number of mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 and/or D2 conditions.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Adequate anaesthesia and analgesia will be used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Some of the animal lines might experience discomfort due to the genetic modification of a gene or microRNA. This is expected in 5% of the animal lines that are being studied.

Explain why these effects may emerge.

These effects might occur due to genetic modification of a gene or microRNA

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals. If we unexpectedly observed weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort animals will be taken out of experiment and sacrificed.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort.

Indicate the likely incidence.

Expected in <5% of the new lines generated

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The cumulative discomfort in the genetic models will maximally consist of moderate discomfort due to:

- the genetic modification (< 5% of lines)
- tissue sampling for genotyping
- maximally 2 routes of administration of transgene inducing or deleting agents
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

The cumulative discomfort in the models injected with a virus or microRNA therapeutic will maximally consist of moderate discomfort due to:

- inject a virus or microRNA therapeutic by maximally 2 routes of administration
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

Neonatal mice: 100% moderate. This is likely an overestimation of the discomfort, but the true discomfort will be assessed for each individual experiment.

Adult mice: 100% moderate. This is likely an overestimation of the discomfort, but the true discomfort will be assessed for each individual experiment.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

All animals are killed to use their organs in ex vivo analyses.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3.4.4.5	Type of animal procedure Myocardial infarction / Ischemia Reperfusion

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (3.4.4.5).

To study the cardiac function of a gene, microRNA or (stem) cell in **heart regeneration**, the appropriate mouse line will be exposed to ischemic injury (MI or IR). These mouse models can be used in studies without further intervention or we add an additional therapeutic intervention (drug or exercise) to determine the effect on heart function, behavior or molecular read outs

The different components of the proposed experiments are:

Animal model (indicated on flowchart with A):

To test a research hypothesis in vivo we will use an appropriate mouse model. This can be done in wild type mice, genetically modified mice, or mice in which gene or microRNA levels have been modulated in vivo by a virus (such as adeno associated virus or lentivirus). In some cases we might need to use mice that got transplanted with cells to study the in vivo effect of specific cells or cellular derivatives.

Considerations for choosing a mouse model:

- Wild type mouse

Wild type mice will be used if we want to study the effect of myocardial infarction or a different pathological stress in the absence or presence of a therapeutic intervention.

- GMM

Genetically modified mice will be used to study the cardiac function of a specific gene, microRNA

or type of (stem) cell. In case a mouse line with the required genetic modification is not available we will generate new mouse line via standard oocyte injection, blastocyst injection, or via the CRISPR/Cas9 system (outlined in Appendix 3.4.4.2)

- Mouse injected with virus to increase or inhibit a gene or microRNA

In case genetic approaches fail to provide appropriate mouse lines, we will revert to viral vectors to increase or inhibit a gene or microRNA by systemic dosing. Viral vectors can also be used to manipulate a gene or microRNA more locally via intracardiac injection

- Wild type mice or GMM transplanted with cells or derivatives

In case we want to study the cardiac effect of cell-based treatments, we will transplant (stem) cells or derivatives in either wild type or genetically modified mice.

Cardiac stress (indicated on flowchart with B):

- Myocardial infarction (MI or IR)

Mice will receive a myocardial infarction (permanent occlusion (MI or ischemia followed by reperfusion (IR)) when we want to study the function of a gene, microRNA or (stem) cell in cardiac repair / regeneration.

Intervention (indicated on flowchart with C):

- No intervention

Mouse lines will receive no intervention in case we want to study the cardiac function of a gene, microRNA or (stem) cell under basal conditions.

- Deliver a drug compound

- Exercise

Readouts /endpoint (indicated on flowchart with D)

- Cardiac function

- Behavior

- Ex vivo analysis of cells and tissues

In all experiments, we will determine cardiac function and determine the general behavior of the animals. All mice will be sacrificed for detailed analysis of the heart and other tissues involved in aspects of heart disease (lungs, kidneys liver). Analysis will include histology and molecular analysis. Also, cells from organs might be isolated by FACS for subsequent analysis.

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

Animal model (indicated on flowchart with A):

- Mice are ordered from a commercial, NVWA licensed breeder or from a registered commercial company, or are generated by ourselves under protocol 3.4.4.2.
- Tissue sampling for genotyping and identification will be done via ear, toe and/or tail biopsy under anaesthesia (4% (isoflurane/oxygen)).
- In some cases we will administer transgene inducing or deleting agents alone or in combination, continuously or intermittently by one or maximally 2 of the following routes:
 - o in diet or drinking water (max. 1 time, < 2 wks)
 - o subcutaneous injection (max. 3 times)
 - o intraperitoneal injection (max. 7 times)
 - o implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia
 - o implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia
 - o oral (max. 10 times)
- In some cases we will inject a virus or microRNA therapeutic by one or maximally 2 of the following routes:
 - o Intravenous injection (max. 10 times)
 - o Subcutaneous injection (max. 10 times)
 - o Intraperitoneal injection (max. 10 times)

- In some cases WT or GM mice will be transplanted with cells under adequate anaesthesia and analgesia
- In some cases we will administer a labelling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:
 - o intraperitoneal injection (1 time)
 - o implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - o intravenous injection (1 time)

Cardiac stress (indicated on flowchart with B):

- **Myocardial infarction (MI):** We will perform MI by permanent ligation of the LAD if we want to induce a large insult causing a more severe stress than when giving mice an ischemic insult and reperfusion the vessel later on (as happens during IR).
 - o Mice will be weighed and anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine by IP injection. Toe pinch will be done to determine whether the pain reflexion is absent.
 - o A tracheal tube will be placed and the mouse connected to a ventilator.
 - o Hair will be removed from the ventral surface of the neck and thorax. The surgical site will be cleaned with iodine and 70% ethanol.
 - o Using aseptic technique with sterile instruments, the skin will be incised left of the midline to allow access to the third intercostal space.
 - o Pectoral muscles will be retracted and the intercostal muscles cut caudal to the third rib. Wound hooks will be placed to allow access to the heart.
 - o The pericardium will be incised longitudinally and the left anterior descending coronary artery (LAD) identified.
 - o In case of **MI** a 7-0 silk suture will be placed beneath the LAD.
 - o In case of **sham** the rib cage will be open and closed.
 - o The rib cage will be closed with 5-0 silk suture and the skin closed with a wound clip.
 - o The animal will be disconnected from the ventilator, the tracheal tube removed and the animal placed unrestrained on a nose cone with 100% oxygen till he wakes up.
 - o The whole surgery is done on a 39 degrees heat mat.
 - o To alleviate pain or distress adequate anesthesia is provided.
 - o When needed, adequate analgesia will be given 1-3 days after surgery.
- **Ischemia Reperfusion (IR):** We will perform IR by a temporal ligation of the LAD if we want to induce Ischemic injury that is less severe and more closely mimics the clinic where the occluded vessels are reopened in patients that suffer an infarct.
 - o Mice will be weighed and anesthetized with an adequate cocktail of anesthesia. Toe pinch will be done to determine whether the pain reflexion is absent.
 - o A tracheal tube will be placed and the mouse connected to a ventilator.
 - o Hair will be removed from the ventral surface of the neck and thorax with nair. The surgical site will be cleaned with iodine and 70% ethanol.
 - o Using aseptic technique with sterile instruments, the skin will be incised left of the midline to allow access to the third intercostal space.
 - o Pectoral muscles will be retracted and the intercostal muscles cut caudal to the third rib. Wound hooks will be placed to allow access to the heart.
 - o The pericardium will be incised longitudinally and the left anterior descending coronary artery (LAD) identified.
 - o In case of **IR** a 7-0 silk suture will be placed beneath the LAD. A 2-3 mm piece of PE 10 tubing will be placed over the LAD and the ligature secured around the LAD and PE tube. Following by 1hr ischemic period, the ligature will be cut and the PE tubing removed to allow for reperfusion via the LAD.
 - o In case of **sham** the rib cage will be open and closed.
 - o The rib cage will be closed with 5-0 silk suture and the skin closed with a wound clip.
 - o The animal will be disconnected from the ventilator, the tracheal tube removed and the animal placed unrestrained on a nose cone with 100% oxygen till he wakes up.
 - o The whole surgery is done on a 39 degrees heat mat.
 - o To alleviate pain or distress appropriate analgesic is given at completion of surgery.

- When needed, adequate analgesia will be given 1-3 days after surgery..

Intervention (indicated on flowchart with C):

- No intervention
- Deliver a drug compound
 - Systemic delivery of compound or microRNA therapeutic by
 - Subcutaneous injection once weekly or every two weeks for maximally 12 weeks
 - intraperitoneal injection once weekly or every two weeks for maximally 12 weeks
 - implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - Intracardiac delivery of compound or microRNA therapeutic
 - Mice will be anesthetized with appropriate anesthesia.
 - Hair will be removed from the ventral surface of the neck and thorax
 - A tracheal tube will be placed and the mouse connected to a ventilator
 - A surgical plane of anesthesia as judged by lack of pain reflex (toe pinch)
 - The surgical site will be cleaned with iodine and 70% ethanol.
 - Using aseptic technique with sterile instruments, the skin will be incised left of midline to allow access to the third intercostal space. Pectoral muscles will be retracted and the intercostal muscles cut caudal to the third rib. A rib spreader will be placed to allow access to the heart.
 - Drug or microRNA therapeutic compound will be delivered via intracardiac injection.
 - The rib cage will be closed with a suture and the skin closed with tissue adhesive.
 - The animal will be disconnected from the ventilator the tracheal tube removed and the animal placed unrestrained on a nose cone with 100% oxygen in a warm recovery cage until fully ambulatory, at which point the oxygen will be turned off
- Exercise

Swimming exercise starting with 10 minutes 2 times daily with 10 minutes increase each day until 90 minutes, 2 times per day is reached. The 2 x 90 minutes a day will continue for 2 to max 10 weeks (depending on how long it takes to observe cardiac remodeling by echo). The mice will be observed at all times to avoid mice submerging under the water surface.

Readouts /endpoint (indicated on flowchart with D)

- Cardiac function

Cardiac function will be evaluated by echocardiography, ECG or pressure catheters, on sedated, adult mice
- Behavior

Animals will be monitored for general signs of sickness and/or discomfort by looking for immobility, significant weight loss or lack of grooming and/or symptoms of heart failure (like dyspnea and edema). If these signs are unexpectedly observed the animals will be euthanized prematurely
- Ex vivo analysis of cells and tissues

Tissue will be collected for histological and molecular analysis to look at aspects of cell size, survival, proliferation, differentiation, hypertrophy or fibrosis.

The choice of ischemic injury model depends on the specific research questions and the proposed function of the gene or microRNA that is being studied.

The cumulative discomfort in the genetic models will maximally consist of moderate discomfort due to:

- the genetic modification (< 5% of lines)
- tissue sampling for genotyping
- maximally 2 routes of administration of transgene inducing or deleting agents
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- MI or IR surgery

- discomfort due to surgery
- discomfort due to the development of heart disease
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

The cumulative discomfort in the models injected with a virus or microRNA therapeutic will maximally consist of moderate discomfort due to:

- inject a virus or microRNA therapeutic by maximally 2 routes of administration
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- MI or IR surgery
- discomfort due to surgery
- discomfort due to the development of heart disease
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments.

Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Mus musculus; WT, genetically modified or injected with a virus or microRNA therapeutic

Age; adult

Origin; Hubrecht institute or external licensed breeders

Number of animals: 7680 male mice

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand how the heart functions as an organ and how it remodels during disease. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

For the type of experiments described in this procedure, it is difficult to calculate the exact number of animals, since for various experimental setups require different numbers of mice, and the variation and outcome of the experiments are unknown. The number of mice required depends on the intervention (e.g no intervention, drug or microRNA therapeutic delivery or exercise), and the goal of the experiment. For these reasons we have provided a total number of mice based on experience over the past 5 years with these types of experiments in our group. Before we will start an experiment we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe which considerations, facts and results have led to the proposition of the number of animals needed for these experiments.

To study the effect of ischemic injury on the heart after increasing or deleting a gene or microRNA in the combination with no intervention, drug or microRNA therapeutic delivery or exercise on average we use 24 mice per genotype per study. Per line on average 2 different time points will be studied. These groups

of mice will either receive no intervention after surgery or will receive a therapeutic intervention by delivery of a compound or exercise.

We expect to use a maximum of 40 mouse lines for either MI or IR studies over the next 5 years for which we will collect materials at 2 different time points on average.

Since cardiac biology and pathology is really different in males and females because of estrogen signaling in females we only use males for our studies to exclude gender based variation.

24 mice x 2 genotypes x 2 studies x 2 interventions x 40 mouse lines

The **maximum** required number of animals = **7680 male mice**

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Before we consider the import or generation and subsequently analysis of GGM to study the function of a gene or microRNA in the heart, we first will analyze appropriate cell lines, existing patient material or materials available from previous animal studies, which extensively reduces the animal numbers. The use human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum. Also trying to use the newly developed CRISPR/Cas9 method to create new mouse lines will significantly reduce the number of animals needed to generate a new line.

However, animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms in cardiac biology and disease. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible. Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice do not show any discomfort we will keep the mice on a homozygous background for breeding purposes, thereby reducing the number of mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 and/or D2 conditions.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Adequate anaesthesia and analgesia will be used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Some of the animal lines might experience unexpected discomfort after ischemic injury

Explain why these effects may emerge.

This may occur if the gene or microRNA that has been modulated in the mice has a crucial function during in heart regeneration that can now no longer be fulfilled.

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals. If we unexpectedly observed weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort, the absence of grooming or symptoms of heart failure like dyspnea and edema, the animals will be taken out of experiment and sacrificed.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort, the absence of grooming or symptoms of heart failure like dyspnoea and edema.

Indicate the likely incidence.

<0.1%

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The cumulative discomfort in the genetic models will maximally consist of moderate discomfort due to:

- the genetic modification (< 5% of lines)
 - o Mild discomfort: >95%
 - o Moderate discomfort: <5%. Animals that do show a phenotype under basal conditions will not receive a cardiac stress.
- tissue sampling for genotyping
- maximally 2 routes of administration of transgene inducing or deleting agents
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- MI or IR surgery
 - o Sham surgery: 100% mild discomfort,
 - o MI surgery:
 - animals that die during surgery: 15% mild discomfort
 - animals that die during first few days after surgery: 10% mild discomfort
 - animals that survive till sacrifice: 75% moderate discomfort
 - o IR surgery:
 - animals that die during surgery: 10% mild discomfort
 - animals that die during first few days after surgery: 10% mild discomfort
 - animals that survive till sacrifice: 80% moderate discomfort
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

The cumulative discomfort in the models injected with a virus or microRNA therapeutic will maximally consist of moderate discomfort due to:

- inject a virus or microRNA therapeutic by maximally 2 routes of administration
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- MI or IR surgery
 - o Sham surgery: 100% mild discomfort,
 - o MI surgery:
 - animals that die during surgery: 15% mild discomfort
 - animals that die during first few days after surgery: 10% mild discomfort
 - animals that survive till sacrifice: 75% moderate discomfort
 - o IR surgery:
 - animals that die during surgery: 10% mild discomfort
 - animals that die during first few days after surgery: 10% mild discomfort
 - animals that survive till sacrifice: 80% moderate discomfort
- Discomfort due to surgery
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

Cumulative level of discomfort:

100% moderate. This is likely an overestimation of the discomfort, but the true discomfort will be assessed for each individual experiment.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

All animals are killed to use their organs in ex vivo analyses.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3.4.4.6	Type of animal procedure Models for pathological remodeling

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart (3.4.4.6)

In case we want to study the function of a gene, microRNA or specific cell type in **pathological remodeling**, we can use mice in which a gene, microRNA or (stem) cell component has been modified after which we expose the animals to a stress that induces a pathological remodeling response. These mouse models can be used in studies without further intervention or we add an additional therapeutic intervention (drug or exercise) to determine the effect on heart function, behavior or molecular read outs.

The different components of the proposed experiments are (see also the flowchart in appendix 1):

Mouse model (indicated on flowchart with A):

To test a research hypothesis in vivo we will use an appropriate mouse model. This can be done in wild type mice, genetically modified mice, or mice in which gene or microRNA levels have been modulated in vivo by a virus (such as adeno associated virus or lentivirus). In some cases we might need to use mice that got transplanted with cells to study the in vivo effect of specific cells or cellular derivatives.

Considerations for choosing a mouse model:

- Wild type mouse

Wild type mice will be used if we want to study the effect of a pathological stress in the absence or presence of a therapeutic intervention.

- GMM
Genetically modified mice will be used to study the cardiac function of a specific gene, microRNA or type of (stem) cell. In case a mouse line with the required genetic modification is not available we will generate new mouse line via standard oocyte injection, blastocyst injection, or via the CRISPR/Cas9 system (outlined in Appendix 3.4.4.2)
- Mouse injected with virus to increase or inhibit a gene or microRNA
In case genetic approaches fail to provide appropriate mouse lines, we will revert to viral vectors to increase or inhibit a gene or microRNA by systemic dosing. Viral vectors can also be used to manipulate a gene or microRNA more locally via intracardiac injection
- Wild type mice or GMM transplanted with cells or derivatives
In case we want to study the cardiac effect of cell-based treatments, we will transplant (stem) cells or derivatives in either wild type or genetically modified mice.

Cardiac stress (indicated on flowchart with B):

- Mice will receive a pathological stress when we want to study the function of a gene, microRNA or (stem) cell in pathological remodeling. Pathological stress models to induce remodeling:
 - TAB
 - high-salt or high-cholesterol diet
 - remodeling agent
 - exercise to trigger disease

The choice of stress depends on the specific research questions and the proposed function of the gene or microRNA that is being studied.

Intervention (indicated on flowchart with C):

- No intervention
Mouse lines will receive no intervention in case we want to study the cardiac function of a gene, microRNA or (stem) cell under basal conditions.
- Deliver a drug compound
- Exercise

Readouts /endpoint (indicated on flowchart with D)

- Cardiac function
- Behavior
- Ex vivo analysis of cells and tissues

In all experiments, we will determine cardiac function and determine the general behavior of the animals. All mice will be sacrificed for detailed analysis of the heart and other tissues involved in aspects of heart disease (lungs, kidneys liver). Analysis will include histology and molecular analysis. Also, cells from organs might be isolated by FACS for subsequent analysis.

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

Animal model (indicated on flowchart with A):

- Mice are ordered from a commercial, NVWA licensed breeder or from a registered commercial company, or are generated by ourselves under protocol 3.4.4.2.
 - Tissue sampling for genotyping and identification will be done via ear, toe and/or tail biopsy, under anaesthesia (4% (isoflurane/oxygen)).
 - In some cases we will administer transgene inducing or deleting agents alone or in combination, continuously or intermittently by one or maximally 2 of the following routes:
 - o in diet or drinking water (max. 1 time, < 2 wks)
 - o subcutaneous injection (max. 3 times)
 - o intraperitoneal injection (max. 7 times)
 - o implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia
 - o implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and
-

- o analgesia
 - o oral (max. 10 times)
- In some cases we will inject a virus or microRNA therapeutic by one or maximally 2 of the following routes:
 - o Intravenous injection (max. 10 times)
 - o Subcutaneous injection (max. 10 times)
 - o Intraperitoneal injection (max. 10 times)
- In some cases WT or GM mice will be transplanted with cells under adequate anaesthesia and analgesia
- In some cases we will administer a labelling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:
 - o intraperitoneal injection (1 time)
 - o implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - o intravenous injection (1 time)

Cardiac stress (indicated on flowchart with B):

- TAB
 - o Hair over the site of incision will be removed with clippers and nair
 - o Animal will be sedated using ketamine xylazine mix
 - o Ketamine will be supplemented with isoflurane (nosecone) using 100% oxygen as a carrier gas
 - o Skin will be disinfected with surgical iodine using standard surgical sterile preparative techniques
 - o The appropriate plane of anesthesia will be determined based on observations of spontaneous respiration and pain reflexes (toe pinch). Level of anesthesia will be continually monitored throughout the surgery
 - o Sterile instruments, supplies and suture material will be used. Instruments used on the surface of the skin will be segregated from those used later in the procedure
 - o The transverse thoracic aorta will be accessed via a left lateral thoracotomy. Suture material will be used to ligate the transverse aorta and an overlying needle. After ligation, the needle will be removed immediately leaving a discrete region of stenosis in the aorta. In published studies, this degree of stenosis is associated with a 40•0 mm Hg gradient.
 - o The chest will be closed and the animals will be observed during recovery from anesthesia. The surgical site will be monitored daily for signs of infection or wound dehiscence. Appropriate analgesia will be administered postoperatively when needed.
- High-salt or high-cholesterol diet

Animals will be put on a high-salt or high-fat content diet for the duration of 2-6 months to establish a pathological effect on the heart as determined by echocardiography.
- Remodeling agent
 - o Systemic delivery of remodeling agent by
 - Subcutaneous injection
 - intraperitoneal injection once weekly or every two weeks
 - implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
- Exercise to trigger disease

Swimming exercise for 2 x 90 minutes a day will continue for 2 to max 10 weeks (depending on how long it takes to observe cardiac remodeling by echo) in mouse line that is genetically predisposed to develop cardiac disease. The mice will be observed at all times to avoid mice submerging under the water surface.

Intervention (indicated on flowchart with C):

- No intervention
- Deliver a drug compound
 - o Systemic delivery of compound or microRNA therapeutic by
 - Subcutaneous injection once weekly or every two weeks for maximally 12 weeks
 - intraperitoneal injection once weekly or every two weeks for maximally 12 weeks
 - implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - o Intracardiac delivery of compound or microRNA therapeutic
 - Mice will be anesthetized with a mixture of ketamine and sodium pentobarbital by ip injection. Hair will be removed from the ventral surface of the neck and thorax.
 - A tracheal tube will be placed and the mouse connected to a ventilator
 - A surgical plane of anesthesia as judged by lack of pain reflex (toe pinch)
 - The surgical site will be cleaned with iodine and 70% ethanol.
 - Using aseptic technique with sterile instruments, the skin will be incised left of midline to allow access to the third intercostal space. Pectoral muscles will be retracted and the intercostal muscles cut caudal to the third rib. A rib spreader will be placed to allow access to the heart.
 - Drug or microRNA therapeutic compound will be delivered via intracardiac injection.
 - The rib cage will be closed with 5-0 silk suture and the skin closed with tissue adhesive.
 - The animal will be disconnected from the ventilator the tracheal tube removed and the animal placed unrestrained on a nose cone with 100% oxygen in a warm recovery cage until fully ambulatory, at which point the oxygen will be turned off
- Exercise to induce cardioprotection

Swimming exercise starting with 10 minutes 2 times daily with 10 minutes increase each day until 90 minutes, 2 times per day is reached. The 2 x 90 minutes a day will continue for 2 to max 10 weeks (depending on how long it takes to observe cardiac remodeling by echo). The mice will be observed at all times to avoid mice submerging under the water surface.

This intervention will not be used in the mouse lines where we use swimming exercise to trigger disease.

Readouts /endpoint (indicated on flowchart with D)

- Cardiac function

Cardiac function will be evaluated by echocardiography, ECG or pressure catheters on sedated, adult mice
- Behavior

Animals will be monitored for general signs of sickness and/or discomfort by looking for immobility, significant weight loss or lack of grooming and/or symptoms of heart failure (like dyspnea and edema). If these signs are unexpectedly observed the animals will be euthanized prematurely
- Ex vivo analysis of cells and tissues

The choice of stress depends on the specific research questions and the proposed function of the gene or microRNA that is being studied.

The cumulative discomfort in the genetic models will maximally consist of discomfort due to:

- the genetic modification (< 5% of lines)
- tissue sampling for genotyping
- maximally 2 routes of administration of transgene inducing or deleting agents
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- pathological stress
- discomfort due to the development of heart disease

- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

The cumulative discomfort in the models injected with a virus or microRNA therapeutic will maximally consist of discomfort due to:

- inject a virus or microRNA therapeutic by maximally 2 routes of administration
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- pathological stress
- discomfort due to the development of heart disease
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments.

Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Mus musculus; WT, genetically modified or injected with a virus or microRNA therapeutic

Age; adult

Origin; Hubrecht institute or external licensed breeders

Number of animals: 4800 male mice

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand how the heart functions as an organ and how it remodels during disease. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

For the type of experiments described in this procedure, it is difficult to calculate the exact number of animals, since for various experimental setups require different numbers of mice, and the variation and outcome of the experiments are unknown. The number of mice required depends on the intervention (e.g. no intervention, drug or microRNA therapeutic delivery or exercise), and the goal of the experiment. For these reasons we have provided a total number of mice based on experience over the past 5 years with these types of experiments in our group. Before we will start an experiment we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe which considerations, facts and results have led to the proposition of the number of animals needed for these experiments.

To study the effect of a pathological stress on the heart after increasing or deleting a gene or microRNA in the combination with no intervention, drug or microRNA therapeutic delivery or exercise we use on average 20 WT and GM mice. Our extensive experience has thought us that this number is usually sufficient to detect a significant effect. In most lines 2 different time points will be studied. These groups of mice will either receive no intervention after surgery or will receive a therapeutic intervention by delivery of a compound or exercise.

We expect to use a maximum of 30 different mouse lines over the next 5 years for pathological stress studies.

Since cardiac biology and pathology is really different in males and females because of estrogen signaling in females we only use males in our in vivo studies to exclude gender based variation.

20 mice x 2 genotypes x 2 time points x 2 interventions x 30 mouse lines

The **maximum** required number of animals = **4800 male mice**

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Before we consider the import or generation and subsequently analysis of GGM to study the function of a gene or microRNA in the heart, we first will analyze appropriate cell lines, existing patient material or materials available from previous animal studies, which extensively reduces the animal numbers. The use human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum. Also trying to use the newly developed CRISPR/Cas9 method to create new mouse lines will significantly reduce the number of animals needed to generate a new line.

However, animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms in cardiac biology and disease. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible. Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice do not show any discomfort we will keep the mice on a homozygous background for breeding purposes, thereby reducing the number of mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 and/or D2 conditions.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Adequate anaesthesia and analgesia will be used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Some of the animal lines might experience unexpected discomfort after a pathological stress

Explain why these effects may emerge.

This may occur if the gene or microRNA that has been modulated in the mice has a crucial function during in pathological remodelling that can now no longer be fulfilled.

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals. If we unexpectedly observed weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort, the absence of grooming or symptoms of heart failure like dyspnea and edema, the animals will be taken out of experiment and sacrificed.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort, the absence of grooming or symptoms of heart failure like dyspnea and edema.

Indicate the likely incidence.

Although some of our new mouse lines are intended to cause a cardiac disease phenotype it is unlikely that the severity is such that it would introduce humane endpoints.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The cumulative discomfort in the genetic models will maximally consist of moderate discomfort due to:

- the genetic modification (< 5% of lines)
 - o Mild discomfort: >95%
 - o Moderate discomfort: <5%. Animals that do show a phenotype under basal conditions will not receive a cardiac stress.
- tissue sampling for genotyping
- maximally 2 routes of administration of transgene inducing or deleting agents
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- pathological stress
 - o Control animals: 100% mild discomfort due to procedure
 - o Mice exposed to cardiac stress: 100% moderate discomfort due to the development of cardiac disease
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

The cumulative discomfort in the models injected with a virus or microRNA therapeutic will maximally consist of moderate discomfort due to:

- inject a virus or microRNA therapeutic by maximally 2 routes of administration
- administration of a labelling agent
- transplantation of cells under adequate anaesthesia and analgesia
- pathological stress
 - o Control animals: 100% mild discomfort due to procedure
 - o Mice exposed to cardiac stress: 100% moderate discomfort due to the development of cardiac disease
- systemic or intracardiac delivery of a drug or exposure to exercise
- sedation to determine cardiac function by echo
- sacrifice

Cumulative level of discomfort:

100% moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

All animals are killed to use their organs for ex vivo analysis

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD/801002015250
2. Titel van het project: The molecular basis of cardiac diseases and recovery.
3. Titel van de NTS: De moleculaire basis van hartziekten.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: KNAW
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 22-09-2015
 - aanvraag compleet: 09-10-2015
 - in vergadering besproken: 01-10-2015
 - anderszins behandeld: n.v.t.
 - termijnonderbreking(en): n.v.t.
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen:
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD: 13-10-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum: n.v.t.
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
8. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum 02-10-2015
 - Strekking: completering van de aanvraag
 - Datum antwoord: 09-10-2015
 - Strekking van de antwoorden: de aanvraag is gecompliceerd
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): geen

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag. Er is overlap met een aantal al van een positief advies voorziene DEC-protocollen. De experimentele groepen van

deze DEC protocollen zullen worden geclassificeerd als Type Dierproeven zoals beschreven in de bijlagen van de aanvraag en zullen bij verlening van de vergunning onderdeel uitmaken van de vergunning (Zie bijlage II van de aanvraag).

3. De DEC is competent om over deze projectvergunningsaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is wetenschappelijk verantwoord. De indiener heeft een duidelijk overzicht gegeven van de reeds behaalde resultaten (Bijlage I), van het nu lopende onderzoek en welke specifieke factoren en cellulaire processen onderwerp van de huidige studies zijn (Bijlage II). Het lopende onderzoek maakt reeds gebruik van de reeks samenhangende dierproeven zoals die beschreven zijn in de verschillende bijlagen "Type Dierproeven" van de aanvraag. De DEC beschouwt de beschreven werkwijze, inclusief de dierproeven, als een coherent geheel en het geeft een goed beeld van de wetenschapsstrategie van de onderzoeksgroep: van hypothese tot resultaat (bijlage "Flow chart"). De groep werkt nu, met succes, volgens de beschreven strategie en wil die de komende 5 jaar op vergelijkbare manier voortzetten. Het overkoepelend doel is het verkrijgen van wetenschappelijke kennis over de biologische mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan en het herstel van hartziekten. *Op basis hiervan acht de DEC het project een toetsbare eenheid.* De toekomstige experimenten op basis van *nieuwe specifieke hypotheses* over de betrokkenheid van een specifiek moleculair-biologisch of cellulair mechanisme, zullen aan de IvD-Hubrecht Instituut worden voorgelegd.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie fundamenteel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De doelstelling, in relatie tot de uitvoering, is helder omschreven; te weten het verkrijgen van fundamenteel wetenschappelijke inzichten in het identificeren en bestuderen van de moleculair-biologische en cellulaire mechanismen (genen, microRNAs, factoren, (stam)cellen, fysieke inspanning) die belangrijk zijn voor het ontstaan en het herstel van hartziekten. Als onderdeel van de betrokkenheid van een moleculair-biologisch of cellulaire mechanisme wordt ook onderzocht of het mechanisme een mogelijke therapeutische waarde heeft. Op termijn kunnen de resultaten leiden tot nieuwe behandelingsmethoden voor patiënten met hartziekten. De projectleider heeft banden met een bedrijf dat zich richt op het ontwikkelen van op microRNA-gebaseerde therapieën voor hartziekten in patiënten; een concreet voorbeeld van hoe de resultaten kunnen dienen als

uitgangspunt voor het opzetten van nieuwe behandelingsmethoden voor patiënten met hartziekten.

Het project richt zich specifiek op de moleculair-biologische en cellulaire mechanismen die betrokken zijn bij de regeneratie en herstel na permanente of langdurige afsluiting van de kransslagaders en de mechanismen die leiden tot pathologische veranderingen van het hartweefsel gekenmerkt door een hypertrofie van de hartspiercellen en fibrose van het hartspierweefsel (remodellering). In beide gevallen is het resultaat een verlies van de pompfunctie van het hart. Voor het onderzoek naar de mechanismen die een rol spelen bij het ontstaan en herstel van hartziekten worden verschillende experimentele modellen in de muis gebruikt. Uitgangspunt is telkens de hypothese dat een specifiek gen, microRNA, of (stam)celtype, zoals geïdentificeerd in een aantal screeningsexperimenten (reeds uitgevoerd of als onderdeel van Type Dierproef 3.4.4.5 en 3.4.4.6) of op basis van literatuurgegevens, betrokken is bij bovengenoemde hartziekten en dat door modulatie van de functie van het specifiek gen, microRNA, (stam)celtype of fysieke inspanning het verloop van de hartziekte kan worden beïnvloed in positieve of negatieve zin. De onderzoekers laten zien dat veelal dezelfde mechanismen betrokken zijn in beide vormen van hartziekte en volgen daarom de strategie om diermodellen voor zowel regeneratie en herstel en voor remodellering van hartweefsel te bestuderen. De DEC ziet deze integrale benadering als een belangrijk kenmerk van het project.

Het fundamenteel wetenschappelijke belang acht de DEC substantieel.

Het verkrijgen van deze fundamenteel wetenschappelijke kennis is essentieel voor het ontwikkelen van nieuwe en/of verbeterde therapeutische strategieën voor de behandeling van hartziekten en dit is naar de mening van de DEC een substantieel belang. Het project dient hiermee een belangrijk maatschappelijk belang, mede gezien de grote groep patiënten met hartziekten waarvoor een effectieve behandeling op dit moment niet beschikbaar is.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak in combinatie met de infrastructuur op het Hubrecht Instituut en de expertise van de betrokken onderzoeksgroep bieden een realistisch uitzicht op het behalen van de beoogde doelstellingen binnen gevraagde looptijd van het project. Het project bouwt voort op een langlopende lijn van onderzoek van een grote groep onderzoekers. Over de afgelopen jaren zijn met een vergelijkbare strategie en integrale aanpak belangrijke wetenschappelijk resultaten behaald, resulterend in vele publicaties in vooraanstaande tijdschriften. Het onderzoek in dit zeer competitieve veld wordt financieel gesteund door verschillende onafhankelijke subsidiegevers. Er zijn internationale samenwerkingsverbanden met andere laboratoria actief in dit onderzoeksveld.

Naar de mening van de DEC is een projectduur van 5 jaar reëel overwegende de strategie waarbij een telkens nieuwe mechanismen worden onderzocht op een

manier vergelijkbaar met het onderzoek van deze groep zoals dat over de afgelopen jaren is uitgevoerd. De publicatielijst en de huidige plannen (Bijlage I en II) ondersteunen dit.

5. Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.
6. Het cumulatieve ongerief gepaard gaand met de dierproeven, zoals beschreven in de verschillende type dierproeven, is naar inschatting van de DEC licht (Type dierproef 1) of matig (Type dierproef 2-6). Er is een beperkt risico op onbedoelde bijwerkingen. Deze inschatting van de DEC is in overeenstemming met het niveau van cumulatief ongerief zoals dat is geclassificeerd door de onderzoekers. Dit is gebaseerd op hun ruime ervaring met de gebruikte modellen in vergelijkbare dierproeven.
7. Binnen het project wordt maximaal gebruik gemaakt van methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk **vervangen**. Een belangrijk onderdeel van de experimentele strategie is de gefaseerde opzet. In de eerste fase vindt een uitgebreid literatuuronderzoek plaats en onderzoek op materiaal verzameld bij eerder uitgevoerde proeven, op patiëntmateriaal en op cellijnen. Na deze fase is er go/no-go-beslissingsmoment voor het onderzoek met neonatale cardiomyocyten (type Dierproef 3.4.4.1 – licht ongerief). Vervolgens is er een beslissingsmoment voorafgaand tot de uitvoering van dierproeven met meer ongerief. Nieuwe inzichten in de moleculair-biologische en cellulaire processen betrokken bij hartziekten kunnen op dit moment alleen maar verkregen worden in een intact levend organisme. Deze processen, waarbij verschillende typen cellen betrokken zijn binnen een gecompliceerde anatomische context, zijn zeer complex en kunnen niet met cellijnen worden bestudeerd. Naar het oordeel van de DEC zijn er geen alternatieven beschikbaar voor het voorgestelde gebruik van intacte levende dieren om te doelstelling van dit project te realiseren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van **vermindering** van dierproeven. De onderzoeksgroep heeft een jarenlange ervaring opgebouwd met dit soort experimenten en door een veelal gefaseerde opzet wordt per experiment niet meer dan het minimaal benodigde aantal dieren ingezet. Voorafgaand aan de kwantitatieve experimenten wordt op basis van literatuurgegevens, eigen historische data of een specifiek hiertoe uitgevoerd pilot experiment de groepsgrootte bepaald. Technieken en procedures worden zorgvuldig toegepast. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch geschat.

9. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van **verfijning** van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd.

Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn en wel op de volgende manieren: 1) het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig, 2) een intensieve monitoring van de proefdieren na de inductie van hartfalen, 3) het gebruik van weefsel-specifiek genetisch-gemodificeerde muizen, 4) een monitoring op het optreden van onverwacht constitutioneel ongerief van nieuwe gecreëerde genotypes.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is geformuleerd in begrijpelijke taal. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

De centrale vraag voor de ethische afweging is of het belang van het doel van dit project opweegt tegen het ongerief dat de dieren ondergaan (geclassificeerd voor het merendeel van de dieren als matig). Het doel van het project is het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Centraal staat het identificeren en bestuderen van de moleculair-biologische en cellulaire mechanismen (genen, microRNAs, factoren, (stam)cellen, fysieke inspanning) die belangrijk zijn voor het ontstaan en het herstel van hartziekten.

Het onderzoek is primair fundamenteel wetenschappelijk van karakter. De verwachting is dat de resultaten op den duur kunnen bijdragen aan nieuwe of verbeterde therapieën voor hartpatiënten.

Het fundamenteel wetenschappelijke onderzoek in dit project is van aangetoonde en excellente kwaliteit. De onderzoeksgroep beschikt over ruime ervaring met de gekozen onderzoeksstrategie en met de beschreven type dierproeven.

De classificatie van het ongerief van de dieren in de verschillende typen dierproeven is merendeel matig. Bij de uitvoering van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald.

De DEC is van mening dat de resultaten van dierproeven zullen bijdragen aan het behalen van het geformuleerde doel en schat de kans op het realiseren van de fundamenteel wetenschappelijke doelstellingen in als hoog. Het project is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord. De verkregen fundamenteel wetenschappelijke kennis is essentieel om te kunnen komen tot nieuwe therapeutische benaderingen of van een verbetering van bestaande therapieën in patiënten met hartziekten. De experimenten geven hiertoe een eerste aanzet. Het gaat om een grote groep patiënten met in veel gevallen een slechte prognose. Het

maatschappelijk belang is daarom groot.

De DEC komt tot de conclusie dat de doeleinden van het project het voorgestelde gebruik van de proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief van de proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - ✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen**
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's gesignaleerd tijdens het beoordelen van de aanvraag of het formuleren van het advies.

Appendix I: Results obtained so far with studies related to heart regeneration and pathological remodeling (publication list).

Heart regeneration and repair

*These following papers describe mouse studies in which we either induce myocardial infarction or ischemia reperfusion to study aspects of heart regeneration and pathological remodelling. The factors or cellular mechanisms are **indicated**.*

1. [REDACTED] Lillian B. Sutherland, Jeffrey E. Thatcher, J. Micheal DiMaio, Rao H. Naseem, William S. Marshall, Joseph Hill and Eric N. Olson. (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of **miR-29** in cardiac fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(35):13027-32. Epub 2008 Aug 22.
2. [REDACTED] Jens Fielitz, Lillian B. Sutherland, Victor L. Thijssen, Harry J. Crijns, Michael J. Dimaio, John Shelton, Leon J. De Windt, Joseph A. Hill, Eric N. Olson. **Myocyte Enhancer Factor 2 and Class II Histone Deacetylases** Control a Gender-Specific Pathway of Cardioprotection Mediated by the Estrogen Receptor. (2010) Circ Res. 106(1):155-65. Epub 2009 Nov 5.
3. Thomas G. Hullinger, Rusty L. Montgomery, Anita G. Seto, Brent A. Dickinson, Joshua M. Lynch, Christianna Stack, Paul Latimer, Christina M. Dalby, Katie H. Robinson, Joshua Hare, Eric N. Olson and [REDACTED]. (2012) LNA-mediated inhibition of **miR-15** protects against cardiac ischemic injury. Circ Res. 110(1):71-81. Epub 2011 Nov 3.
4. Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, Simpson E, Nam YJ, Matkovich SJ, Dorn GW 2nd, [REDACTED], Olson EN. (2011) The **miR-15 Family** Regulates Post-natal Mitotic Arrest of Cardiomyocytes Circ Res. 109(6):670-9.
5. Aurora AB, Mahmoud AI, Luo X, Johnson BA, [REDACTED] Matsuzaki S, Humphries KM, Hill JA, Bassel-Duby R, Sadek HA, Olson EN. (2012) **MicroRNA-214** protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca²⁺ overload and cell death. J Clin Invest. 122(4):1222-32. doi: 10.1172/JCI59327. Epub 2012 Mar 19.

Pathological remodelling

These following papers describe mouse studies in which we induce stress on the heart to study aspects of pathological remodelling.

1. [REDACTED] Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. (2006) A signature pattern of **stress-responsive microRNAs** that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(48):18255-60. Epub 2006 Nov 15
2. [REDACTED] Lillian B. Sutherland, Xiaoxia Qi, James A. Richardson, Joseph Hill and Eric N. Olson. (2007) Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a **microRNA**. Science. 316(5824):575-9. Epub 2007 Mar 22.

3. David Patrick, Rusty L. Montgomery, Xiaoxia Qi, Sakari Kauppinen, Joseph Hill, [REDACTED] and Eric N. Olson. (2010) Stress-dependent cardiac remodeling in the absence of **microRNA-21**. J Clin Invest. 120(11):3912-6. *(Shared last author)*
4. Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, [REDACTED] (2011) Therapeutic inhibition of **miR-208** improves cardiac function and remodeling during heart failure. Circulation.124(14):1537-47. Epub 2011 Sep 6.
5. Grueter CE, [REDACTED] Johnson BA, Deleon SM, Sutherland LB, Qi X, Gautron L, Elmquist JK, Bassel-Duby R, Olson EN. (2012) A Cardiac **MicroRNA** Governs Systemic Energy Homeostasis by Regulation of MED13. Cell. 149(3):671-83.
6. Brent A. Dickinson, Hillary M. Semus, Rusty L. Montgomery, Christianna Stack, Paul A. Latimer, Steven M. Lewton, Joshua M. Lynch, Thomas G. Hullinger, Anita G. Seto, and [REDACTED] (2013) Plasma **miRNAs** serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. Eur J Heart Fail. 15(6):650-9

Societal relevance and societal impact

Heart disease is a modern world epidemic for which there currently are no effective therapies that could stop -or even reverse- disease progression with the exception of heart transplantation or assist devices. Unfortunately, these treatment options are only available to a minute fraction of the population in need of treatment due to donor scarcity, and are accompanied by incredibly high costs. Given the global burden of heart disease and its increasing prevalence, the development of novel therapies is of the utmost importance.

Our work triggered the foundation of miRagen Therapeutics, a biotechnology company focused on the development of microRNA based therapies, of which I am a founder and special advisor. The enthusiasm for developing new therapeutics is further underscored by the \$352M partnership between miRagen and Servier for Research development and commercialization of miRNA-targeting drugs for cardiovascular disease (<http://www.miragentherapeutics.com/4/News/>).

This underscores the importance and relevance of our fundamental studies and how our findings can lead to the development of new therapies for heart disease.

Appendix II: Approved DEC protocols related to cardiac regeneration and pathological remodelling which contain the procedures described in the project proposal.

HI1323.01 The function of miR-208 during cardiac remodelling

Procedures involved:

- antimiR injections
- angiotensin II supplementation
- High salt diet
- Echo and pressure measurements to determine cardiac function

HI1323.05 Cardiac function of miR-208 target genes

Procedures involved:

- Generation transgenic lines
- Angiotensin II supplementation
- High salt diet
- Echo measurements to determine cardiac function

HI1323.07 The role of ZEB2 in cardiac disease

Procedures involved:

- Neonatal rat cardiomyocyte isolation

HI1423.01 The cardiac function of miR-19b in cardiomyocyte survival

Procedures involved:

- Neonatal rat cardiomyocyte isolation

HI1423.02 The cardiac function of miR-499 during physiological hypertrophy

Procedures involved:

- Swimming induced exercise
- Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.03 The cardiac function of miR-19b in cardiomyocyte proliferation

Procedures involved:

- Generation transgenic lines
- Myocardial infarction
- Ischemia reperfusion
- Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.05 Identification of stem cells in heart regeneration

Procedures involved:

- Generation transgenic lines
- Tamoxifen injections
- Myocardial infarction
- Echo measurements to determine cardiac function
- Isolation cardiac stem cells

HI1423.06 Wnt signalling during heart regeneration.

Procedures involved:

- Generation transgenic lines
- Myocardial infarction
- Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.07 MicroRNAs that regulate cardiac Adenylyl Cyclase 6

Procedures involved:

- Neonatal rat cardiomyocyte isolation

HI1423.08 SDF1 in cardiac regeneration

Procedures involved:

- intracardiac injection of drugs
- ischemia reperfusion
- Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.09 Cardiac specific delivery of microRNA therapeutics by UPy-hydrogel-based intramyocardial delivery.

Procedures involved:

- intracardiac injection of microRNA drugs
- ischemia reperfusion
- Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.11 The cardiac function of Zeb2

Procedures involved:

- Myocardial infarction (in transgenic line)
- Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.12 The cardiac function of Zeb2

Procedures involved:

- Myocardial infarction (in cardiac knockout line)
- Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.13 Using CRISPR/Cas to mutate DSP to create a mouse model for Arrhythmic Right Ventricular Dysplasia (ARVD)

Procedures involved:

- Generation transgenic lines
- Exercise to trigger disease
- ECG and Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.14 The uptake and intracellular distribution of antimiRs during cardiac disease.

Procedures involved:

- inject mice with labelled rugs
- ischemia reperfusion

HI1423.15 Identification of stem cells in heart regeneration.

Procedures involved:

- Generation transgenic lines
- Tamoxifen injections
- Myocardial infarction
- Isolation cardiac cells

HI1423.16 Using CRISPR/Cas to mutate PKP2 to create a mouse model for Arrhythmic Right Ventricular Dysplasia (ARVD)

Procedures involved:

- Generation transgenic lines
- Exercise to trigger disease
- ECG and Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.17 Determine clonality of stem cell progeny during heart regeneration.

Procedures involved:

- tamoxifen injections

HI1423.18 Gene expression in response to ischemia reperfusion

Procedures involved:

- Ischemia reperfusion
- Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.19 Regenerative capacities of cardiomyocytes after ischemic damage.

Procedures involved:

- Ischemia reperfusion
- Isolation cardiac cells

HI1423.20 Identification of cKit positive progenitor cells in heart regeneration.

Procedures involved:

- Generation transgenic lines
- Tamoxifen injections
- Myocardial infarction
- Isolation cardiac cells

HI1423.22 MicroRNAs in cardiac regeneration

Procedures involved:

- inject mice with antimiR
- ischemia reperfusion
- Echo measurements to determine cardiac function

HI1423.26 Cell types in the heart that are relevant for repair.

Procedures involved:

- ischemia reperfusion
- collect cardiac cells

With the exception of HI1324.08 all studies are currently still ongoing.

Summary of genes, microRNAs and cell types that are currently being studied in our lab for their function in heart disease:

Gene	microRNA	Cell type
Zeb2	miR-208	Cardiomyocyte
Dynlt	miR-499	Fibroblast
Purbeta	miR-19b	c-kit + cell
DSP	miR-15	Lgr5+ cell
PKP2	miR-1	Cardiac stem cell
AC6	miR-23	
SDF1		
Axin2		
Lgr5		
Lgr6		
Troy		

AVD-801002015250**Overzicht aantal muizen, groepen en ongerief**

Total numbers:

Rats: newborn 2700 and adults 360: 100% mild discomfort

Mice: newborns 400 and adults 36.320: 28% mild discomfort and 72% moderate discomfort

	Procedure	Group	Animals	mild	moderate	Total group
3.4.4.1	Gene (in) activation interventions (ex vivo analysis)	Group 1a	Rat mothers	360		
		Group 1b	Rat neonates	2700		3060 <i>rats</i>
3.4.4.2	Generation Welfare assessment and Breeding of GMM	Group 2	Mice adults 100%	10240	6000	16240
3.4.4.3	Gene (in) activation	Group 3a	Mice pups 5%		240	
		Group 3b	Mice adults 95%		4560	4800
3.4.4.4	Gene (in) activation	Group 4a	Mice pups 5%		160	
		Group 4b	Mice adults 95%		3040	3200
3.4.4.5	Gene (in) activation interventions (myocardial infarction / ischemia reperfusion)	Group 5	Mice adults 100%		7680	7680
3.4.4.6	Gene (in) activation intervention (pathological cardiac stress)	Group 6	Mice adults 100%		4800	4800
			Rats total	3060		
			Mice total			36.720



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen

Postbus Postbus 19121

1000 GC AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD801002015250

Bijlagen

2

Datum 15 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD801002015250. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

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: 80100
Naam instelling of organisatie: Kon. Ned. Academie van Wetenschappen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 54667089
Postbus: Postbus 19121
Postcode en plaats: 1000 GC AMSTERDAM
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Hubrecht Instituut

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Group Leader
Afdeling: [REDACTED]
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: 1 november 2015
Geplande einddatum: 1 november 2020
Titel project: Factors involved in cardiac function and repair
Titel niet-technische samenvatting: De moleculaire basis van hartziekten
Naam DEC: DEC-KNAW
Postadres DEC: ██████████ Amsterdam
E-mailadres DEC: ██████████

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: DEC-advies

Ondertekening

Naam: ██████████
Functie: ██████████
Plaats: Amsterdam
Datum: 12 oktober 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen

Postbus Postbus 19121

1000 GC AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD801002015250

Bijlagen

2

Datum 15 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 15 oktober 2015

Vervaldatum: 14 november 2015

Factuurnummer: 15700250

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD801002015250	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen

Postbus 19121

1000 GC AMSTERDAM



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD801002015250

Datum 23 NOV 2015
Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]
Op 13 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Factors involved in cardiac function and repair" met aanvraagnummer AVD801002015250. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De IvD moet betrokken worden bij go/no go momenten. Overlap van door de DEC goedgekeurde protocollen en deze vergunning moet voorkomen worden. Daarvoor zijn voorwaarden opgenomen in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Factors involved in cardiac function and repair" starten. De vergunning wordt afgegeven van 23 november 2015 tot en met 1 november 2020. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-KNAW gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 oktober 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. De CCD stelt wel algemene voorwaarden aan dit project. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

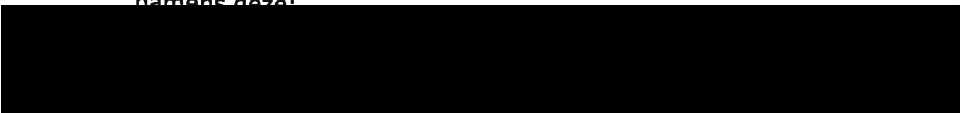
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Kon. Ned. Academie van Wetenschappen
Adres: Postbus 19121
Postcode en plaats: 1000 GC AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 80100

deze projectvergunning voor het tijdvak 23 november 2015 tot en met 1 november 2020, voor het project "Factors involved in cardiac function and repair" met aanvraagnummer AVD801002015250, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-KNAW.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Group Leader .

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 oktober 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 oktober 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 oktober 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 oktober 2015, ontvangen op 13 oktober 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1 Isolation of neonatal rat cardiomyocytes	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / wildtype; adult (mothers); pups (P1-P4)	3060	Licht / mild	2700 neonatal pups, 360 pregnant rats
2 Generation, welfare assessment and breeding genetically modified mice (GMM)	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / WT or genetically modified; adults	6000	Matig / moderate	
3 Collecting (stem) cells or tissue for ex vivo experiments	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / genetically modified or injected with a virus or microRNA therapeutic; neonates p1-p4 and adults	4800	Matig / moderate	240 pups, 4560 adults
4 Drug delivery or exercise	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / WT, genetically modified or injected with a virus or microRNA therapeutic; neonates p1-p4 and adults	3200	Matig / moderate	160 pups, 3040 adults
5 Myocardial infarction / Ischemia Reperfusion	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / WT, genetically modified or injected with a virus or microRNA therapeutic; adult	7680	Matig / moderate	
6 Models for pathological remodeling	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / WT, genetically modified or injected with a virus or microRNA therapeutic, adult	4800	Matig / moderate	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen
De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

Daar waar er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen zullen de dieren en experimenten na het verlenen van deze vergunning

formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals in Appendix II bij uw aanvraag ook heeft aangegeven. Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Inventaris Wob-verzoek W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015268								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	



02 OKT. 2015

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK, Den Haag

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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 / 168
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9

1.3 Vul de gegevens van het postadres in. Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

Straat en huisnummer	Geert Groteplein	10
Postbus	9101	[Redacted]
Postcode en plaats	6500HB	Nijmegen
IBAN	NL90ABNA0231209983	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie		
Afdeling		
Telefoonnummer		
E-mailadres		

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 1 1 . 2 0 1 5 |
| Einddatum | 0 1 . 1 1 . 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechan
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Effecten van het antidepressivum vortioxetine op hersenmechanismen in genetische dier
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | RU DEC |
| Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [redacted] |
| E-mailadres | [redacted] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 30 - 09 - 2015

Handtekening [REDACTED]



Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechanisms in serotonergic genetic rat models. |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> Higher education or training |
|-----|---|--|

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

Depression is a highly burdensome psychiatric condition associated with a lifetime prevalence rate of 20%, specifically in women. Because depression affects adolescents and adults, it significantly inflicts school performance and workplace occupation, and thereby well-being and careers of the people and society as a whole. Whereas pharmacotherapies are available to treat depression, the therapies often have sub-optimal efficacy (many patients respond only partially to treatment and some fail to respond at all), leading to the presence of residual symptoms and cognitive deficits. When considering effectiveness, the sub-optimal response may be due to the limited capability of currently available antidepressants to normalize the molecular and structural alterations that are present in depressed subjects.

A number of studies support the idea that agents working through multiple mechanisms may show a superior effect on both cardinal and comorbid symptoms of depression, when compared to drugs acting on unique targets. Accordingly, combinatory treatments between antidepressants and other molecules (for example antipsychotics or mood stabilizers) have been successfully used to improve the clinical outcome, particularly in resistant patients (Millan, 2006). In this respect, novel drugs targeting receptors and transporters of monoaminergic (serotonergic, dopaminergic, noradrenergic; each of these neurotransmitters consist of one amino acid) systems (hereafter called: **multitarget monoaminergic antidepressiva**) are being developed with the idea to combine the ability to block neurotransmitter reuptake with the activity on selected monoaminergic receptors. One of these drugs is vortioxetine, which combines the inhibition of the serotonin and noradrenaline transporter with specific receptor properties, including 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT₃, and 5-HT₇ (partial) agonism. **Vortioxetine can normalize cognitive deficits as well as depressive-like behavior in different animal models (Mork et al., 2012; Jensen et al., 2013; Li et al., 2013) as well as humans (meta-analysis/clinical trials: Meeker et al., 2015; Pae et al., 2015; Berhan and Barker, 2014), although in humans superior efficacy of vortioxetine compared to mono-target antidepressants is not always found. A reason could be that individual differences in genetic make-up influence its efficacy, which are not taken into account in clinical trials. It is our hypothesis that mono-target antidepressants are most effective in those individuals exhibiting 'high mono amine expressing genotypes' and vortioxetine is most effective in those individuals exhibiting 'low mono amine expressing genotypes'. An example are those people carrying the short (s) allele of the serotonin transporter polymorphism, which leads to reduced serotonin transporter expression compared to long (l) allele carriers. Thereby, the s-allele reflects a low mono amine expressing genotype and the l-allele a high mono**

amine expressing genotype. The s-allele individuals, compared to l-allele individuals, are at increased risk for depression (Caspi et al., 2003). Simultaneously s-allele carriers, compared to l-allele carriers, respond poorly to selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) (meta-analysis: Serretti et al., 2007). A plausible explanation is that 5-HTTLPR s-allele carriers exhibit a reduced transcription of the serotonin transporter gene (Heils et al., 1997), leading to reduced availability of the serotonin transporter, the target of mono-target antidepressant SSRIs. As vortioxetine is a multi-target agent it is expected to have the potency to act through other targets than the serotonin transporter and to have higher efficacy in s-allele carriers compared to SSRIs. Vice versa, l-allele carriers may specifically benefit from mono-target antidepressant, as the target is highly expressed. Polymorphisms in the enzyme encoding for tryptophan hydroxylase 2 (Tph2), the enzyme synthesizing serotonin, has also been linked to risk for depression (Gao et al., 2012), and altered responsivity to single target antidepressant treatment (Tzvetkov MV et al., 2008). If serotonin synthesis and thereby serotonin release is increased (high mono amine expressing genotype), there is more serotonin available for activation of 5-HT receptors and efficacy of SSRIs will be increased. If serotonin synthesis and thereby serotonin release is reduced (low mono amine expressing genotype), there is less serotonin available for activation of 5-HT receptors, efficacy of SSRIs will be reduced and there may be a benefit from vortioxetine treatment. **Testing the hypothesis not only benefits depressed patients carrying the 5-HTTLPR s-allele or Tph2 polymorphisms affecting Tph2 function, but also provides pharmacogenetic insights: whether the efficacy of pharmaceuticals is genotype dependent. This insight will contribute to personalized medicines.** We will test this hypothesis in rats lacking the serotonin transporter (modeling the 5-HTTLPR s-allele) and in rats lacking Tph2. Thus, the knockout (-/- and potentially +/-) animals reflect animals with 'low mono amine expressing genotypes and the wild-type animals (+/+) reflect animals with the high mono amine expressing genotypes.

One target that lying downstream from the modulation of synaptic events and that is relevant for treatment outcome is the neurotrophin BDNF, an important mediator for neuronal plasticity. In the last few years a number of studies have clearly shown that depression is associated with low BDNF levels (Polyakova et al., 2015) and that the expression, processing and trafficking of the neurotrophin BDNF in brain areas involved in mood regulation (prefrontal cortex, hippocampus) is modulated by chronic antidepressant and antipsychotic treatment (Molteni et al., 2006; Calabrese et al., 2007; Calabrese et al., 2011; Fumagalli et al., 2012; Calabrese et al., 2013; Luoni et al., 2013). Of interest, rats with a knockout of serotonin transporter not only exhibit depression-like phenotypes (Olivier et al., 2008), but also show reduced expression of specific BDNF isoforms through epigenetic mechanisms (Molteni et al., 2010). Furthermore, these alterations are corrected by chronic treatment with antipsychotics drugs which do not rely on the blockade of serotonin transporter (Calabrese et al., 2010; Guidotti et al., 2012; Luoni et al., 2013a). Tph2 knockout rats also exhibit depression-like symptoms (Lesch et al., 2012; Gutknecht et al., 2015), but BDNF levels under baseline conditions have not been measured thus far. **Taken together, we also hypothesize that vortioxetine effectively ameliorates depression-like phenotypes in serotonin transporter knockout and Tph2 rats by increasing BDNF levels in the hippocampus and prefrontal cortex through epigenetic mechanisms.**

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

Depression is a highly prevalent psychiatric disease and puts a high burden on society and public health service. Especially those individuals with a genetic predisposition to depression respond poorly to currently available antidepressant drugs. Using rat models for depression - carrying those genetic variants that in humans increase risk for depression and decrease responsiveness to first-line antidepressants - we aim to explore whether a new multitarget monoaminergic antidepressant drug has a better efficacy.

Specifically, we aim to address the following questions:

1. How does a multitarget monoaminergic antidepressant drug, compared to mono-target reference antidepressant drugs, modulate neuroplasticity in genetic rat models for depression?
2. What is the impact of chronic treatment with a multitarget monoaminergic antidepressant drug, compared to mono-target reference antidepressant drugs, on anxious-depressive related behavior in genetic rat models for depression?

The risks of the study are low: The animal models are available, and the experimenters have experience with the proposed experiments. The antidepressant drugs have been tested for toxicology before being used in the type of in vivo experiments as proposed here.

3.3 Relevance

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

Depression mainly affects relatively young people between 25-45 years of age, the majority of them being women, and results in chronic disability and about 40% of absence from work in The Netherlands. Although many antidepressants are available, only 65% of the depressed patients respond to pharmacotherapy. This suggests that the patients who do not respond are characterized by a differential neurobiological make-up compared to those that do respond. "Vulnerability factors", such as genetic variants altering serotonergic homeostasis, like the serotonin transporter promoter polymorphism, modulate the effects of stressors on the pathogenesis of depression, as well as the efficacy of drugs. For instance, if the antidepressant drug partly acts through the serotonin transporter, and there is less serotonin transporter because of a 'low expressing' genotype, **the efficacy of the mono-amine antidepressant drugs may be less in these 'low expressing' individuals, compared to those exhibiting a 'high expressing' genotype. A better understanding of who responds best to multitarget monoaminergic antidepressant drugs (like vortioxetine) and who benefit from mono-amine antidepressant drugs, is needed for personalised treatments, leading to higher therapeutic efficacy and decreased disease burden. Thus, genotype may be used to predict who responds best to what type of antidepressant treatment, reducing trial and error in finding the most effective agent for the specific patient**

3.4 Research Strategy

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

This study aims to test the antidepressant potential of vortioxetine **versus mono-amine antidepressants, as function of genotype as well as gender**, at the level of behaviour and neuronal plasticity. In experiment 1 we decapitate rats treated with the drug or vehicle without prior testing to study the expression of genes involved in neuronal plasticity. In experiment 2 we subject the drug and vehicle treated rats to behavioural tests assessing anxiety and depression-like symptoms, followed by decapitation. In experiment 2 we can additionally investigate whether behavioural testing per se affects the expression of the genes under investigation. We use two rat serotonergic genetic models for depression, and male and female rats.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

Rats and drug treatment:

Adult male and female wild type (SERT+/+ (Wistar) and TPH2+/+ (Agouti)), (SERT+/- (Wistar) and TPH2+/- (Agouti)) and SERT and TPH2 knockout (SERT-/- (Wistar) and TPH2-/- (Agouti)) rats will systemically and chronically be treated (21 days) with vortioxetine (10 mg/kg) and vehicle. We include heterozygous rats, because there is debate whether it are the homozygous or heterozygous animals that best model human polymorphisms. From behavioural perspective it are the homozygous knockout animals, from a gene-dose dependent perspective it are the heterozygous animals. Separate adult wild type (SERT+/+ and TPH2+/+), heterozygous (SERT+/- and TPH2+/-) and SERT and TPH2 knockout (SERT-/- and TPH2-/-) rats will additionally be treated with the following mono-target reference drugs, in order to investigate whether vortioxetine has superior efficacy compared to mono-target antidepressants in the knockout rats, and the reference drugs have superior efficacy in wild-type rats. The reference mono-target antidepressants are:

- Fluoxetine (10 mg/kg): a selective serotonin reuptake inhibitor (Prozac; antidepressant) (Tph2 only, because SERT knockout rats miss the target for fluoxetine). **Fluoxetine is chosen because 5-HTTLR s-allele carriers respond poorly to this mono-amine antidepressant (see background)**
- Reboxetine (10 mg/kg): a selective noradrenaline reuptake inhibitor (Edronax; antidepressant) (SERT and Tph2). **Reboxetine is chosen for the following reason: If vortioxetine (targeting the serotonin and noradrenaline transporter, and 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT3, and 5-HT7 receptors) cannot exert its effects through the serotonin system in SERT and TPH2 knockout rats because it cannot evoke serotonin release in these animals, it must exert its effects through the noradrenaline transporter, which is normally expressed in SERT and Tph2 knockout rats. If this is the case, it is expected that reboxetine and vortioxetine are equally effective in SERT and TPH2 knockout rats. If SERT or TPH2 knockout are associated with compensatory changes (e.g. serotonin reuptake through the noradrenaline transporter as all mono-amine transporters also have slight affinity for other mono-amines; Suarez-Roca and Cubeddu, 2002), vortioxetine efficacy may be superior to reboxetine efficacy in the knockout animals.**

Experiments:

Group 1 will be used for the molecular analyses and they will be sacrificed 24 hours after the last injection.

Group 2 will be used for the behavioral analyses, which will include the open field (OF) test, the elevated plus maze (EPM), the Forced swim tests (FST), the ambiguous cue interpretation test (ACI) and the sucrose self-administration test, and they will be sacrificed 15 min after the FST or ACI or sucrose self-administration. This 15 min timepoint is chosen because it allows us to measure the expression of activity-dependent BDNF isoforms. The OF test is used to measure locomotor activity and anxiety, the EPM is widely accepted as test for anxiety. The FST test is the standard test for depression in rodents, measuring behavioural despair. The ACI test measures the bias towards negative stimuli. Finally, the sucrose self-

administration paradigm is used to assess anhedonia. Decapitation of rats after FST or ACI or sucrose self-administration allows us to assess stress-induced gene expression.

The choice of the depression-related tests matches diagnostic criteria for depression. Depression is diagnosed according to Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (fifth edition) criteria. People have to fulfill 5 of the 9 criteria. Several of these criteria can be measured in rodents, but not all (like guilt and suicidality). Since depression cannot be measured as a whole in animals, we model in rats the most important individual criteria. Using the behavioral tests for depression (sucrose consumption, ACI, FST) we tackle the criteria corresponding to: 1. Markedly diminished interest or pleasure in activities (sucrose consumption), 2. Pessimism/depressed mood (ACI), and 3. Psychomotor retardation (FST).

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

The study as a whole is tailored to investigate the efficacy and working mechanism of a multi-target antidepressant in genetic rat models for depression. In experiment 1 the brain mechanisms at the level of neuronal plasticity are investigated under behavior naive conditions, and in experiment 2 these same mechanisms are investigated after exposure to anxiety- and depression-related tests. The efficacy of vortioxetine compared to mono-target antidepressants is investigated by comparing the brain and behavioural effects of vortioxetine to that of reference drugs (fluoxetine and reboxetine).

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Decapitation
2	Behaviour

Appendix**Description animal procedures**

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Decapitation

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Rats will be chronically treated with vortioxetine or one of the mono-amine antidepressant drugs. The rats are decapitated without anesthesia 24 hours after the last drug injection.

Prefrontal cortex [defined as Cg1, Cg3, and IL sub-regions corresponding to the plates 6 to 10, according to the atlas of Paxinos and Watson] will be dissected from 2-mm thick slices, whereas ventral and dorsal hippocampus will be dissected from the whole brain. The brain specimens will be frozen on dry ice and stored at -80 °C for later analyses.

The outcome measures:

We will perform gene expression and protein analyses with a primary focus on the systems involved in neuronal plasticity, such as the neurotrophin BDNF.

At transcriptional levels we will analyze the mRNA levels of different BDNF transcripts as well as transcription factors that may cooperate in the regulation of neurotrophin. The real-time PCR will be used for the analysis of the gene expression. In particular we will use the TaqMan qRT-PCR instrument (CFX384 real time system, Bio-Rad Laboratories) with the iScript™ one-step RT-PCR kit for probes (Bio-Rad Laboratories). Samples will be run in 384 well formats in triplicate as multiplexed reactions with a normalizing internal standard.

The study will be implemented by the analysis of BDNF protein using specific antibody that allow to measure the mature as well as the precursor form of the neurotrophin. Thus we will have an index of both the synthesis and the processing of the neurotrophin. Moreover protein analysis will carry out in whole cell homogenate as well as in the synaptosomal fraction in order to discriminate between global changes of the neurotrophin with respect to modification occurring at synaptic level, which represent the site of neurotrophin storage and release.

The experimental groups will be as follows:

- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (molecular analysis)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2+/+ fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2+/+ or SERT+/+ reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (molecular analysis)
- TPH2+/- or SERT+/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2+/- or SERT+/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2+/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (molecular analysis)

- TPH2-/- or SERT-/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2-/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)
- TPH2-/- or SERT-/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(molecular analysis)

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

Systemic drug injections (oral gavage, i.p. or s.c.) during 21 days, once per day. The drug administration takes 5 sec-30 sec. This administration protocol is chosen because in humans antidepressant drugs typically require chronic treatment before antidepressant effects are noted. In rodents antidepressant effects are noted after approximately 2 weeks.

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

Because behaviour itself may affect gene expression, we will use separate groups of rats for antidepressant treatment effects on gene expression, and antidepressant treatment effects on behaviour, and subsequently gene expression. All proposed control groups are necessary; data cannot be appropriately interpreted without knowledge about baseline gene expression. We will not include a non-treated control group, in order to reduce the number of required animals. The comparison with no treatment and vehicle treatment is furthermore not of interest, because treatment (and any potential stress related to the treatment) is inherent to the antidepressant treatment.

Group sizes will be determined using a poweranalysis. Based on [REDACTED] we estimate group sizes at 15 per genotype.

B. The animals

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

We use the serotonin transporter knockout (5-HTT) rat and tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) knockout rats, and their wild-type controls, to model the 5-HTTLPR and TPH2 polymorphisms, resp. We use these knockout rats as genetic models for depression.

These genetic rat lines are bred by our group at [REDACTED]

Because gender differences play a role in the pathogenesis of depression (Depression is approximately twice as much more prevalent in women compared to men (Seney and Sibille, 2014)), male and female rats will be used. Another reason to use male and female rats is that there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying depression (Seney and Sibille, 2014). Mostly male animals are used, because of the idea that

female cycle interferes with the experiment and causes a lot of variation among the animals. This appears not to be true according to a meta-analysis: Prendergast et al., 2014. Hence, the inclusion of male and female rats will provide new insight into sex differences in mechanisms involved depression-related pathology and effects of antidepressants.

We use 15 rats per genotype. We have 6 genotypes (Tph2/SERT; +/+; +/-; -/-), 2 sexes, and 4 drugs (vehicle + vortioxetine + reboxetine + fluoxetine). In total we need: $15 \times 6 \times 2 \times 4 = 720$ rats.

Because SERT KO rats will not be treated with fluoxetine, the number of 720 rats will be reduced with $15 (n) \times 3$ (SERT genotypes) $\times 2$ (male/female) = 90 rats.

720-90 = 630 rats are needed

The rats will be tested during adulthood, between postnatal day 70 and 140.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat		630	P70-P120

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

REPLACEMENT: The rat is the best animal model to study human psychiatric disorders. Because of the complexity of these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as neuronal plasticity and neurotrophism, cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints.

REDUCTION: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate effects of the drugs under investigation on molecular mechanisms. As for the number of experimental groups present in this experiment, we will perform both protein and mRNA analyses in the same animals in order to obtain a high number of information. As depression related markers, like those investigated in the present study, are influenced by behavioural assays (e.g. Coyner J et al., 2013, Besnard A et al., 2014), we need a separate group of behavioral naïve animals to assess behavior and to perform the molecular studies. **Finally, we use a blockdesign, such that three compounds are compared to the effects of a single vehicle (saline)**

REFINEMENT: Administration of drugs is unavoidable for answering these questions effectively. Moreover, the analysis we propose cannot be performed without sacrificing animals; As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during sacrifice. Only experienced researchers will administer the drugs and sacrifice the animals.

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

The rats receive daily drug injections. Handling helps to reduce injection stress. The injections have no adverse effects on the animal's health.

Decapitation will be done without anesthesia, because anesthesia interferes with gene expression. Because the decapitation will be done in a fraction of a second, the rats will not suffer.

Rats are socially housed and have cage enrichment.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

n/a

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

H. Pain and pain relief

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

None

Explain why these effects may emerge.

All antidepressant drugs have been approved by FDA for human use and therefore no adverse well-being affecting side-effects are expected. Because the decapitation without anesthesia will be done by an experienced experimenter, and will take place in a fraction of a second, no pain or adverse effects are expected from the decapitation

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

None

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

General humane endpoints will apply: Piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor coat conditions, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, red fur, elephants teeth.

Indicate the likely incidence.

< 2%

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

All animals (630; 6/6) will experience mild stress, including -/- rats receiving vehicle. As long as these animals are not exposure to behavioural challenges they will not experience additional suffering.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

We need the rats brains to assess the mechanisms by which vortioxetine and reference drugs work

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Behaviour</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Behaviour
Serial number	Type of animal procedure					
2	Behaviour					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Rats are chronically systemically treated with vortioxetine or mono-amine antidepressants daily for 21 days, subjected to behavioural tests of anxiety and depression, and decapitated. They are grouped as follows:

Open Field; Elevated plus maze; Forced swim test:

Day 1: First vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug injection

Day 14: Open field test

Day 18: Elevated plus maze test

Day 21: Last vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug injection & day 1 of forced swim test

Day 22: Day 2 of forced swim test & decapitation

Ambiguous cue interpretation (ACI) test:

Day 1: First vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug

Day 2: Start training ACI

Day 21: Last vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug

Day 22: Test day ACI & decapitation

Sucrose self-administration test:

Day 1: First vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug

Day 2: Start training sucrose self-administration

Day 21: Last vortioxetine/fluoxetine/reboxetine or vehicle drug

Day 22: Test day sucrose self-administration & decapitation

We choose for this experimental set-up, because we want the animals to have vortioxetine/fluoxetine/reboxetine drug on board when we perform the behavioural experiments. If we would perform all behavioural experiments in one group of animals, the behavioural experiments would take longer than the duration of treatment and the effects of vortioxetine/fluoxetine/reboxetine would be washed-out. Also, we cannot judge whether

any potential differences in gene expression are due to what test. Using this experimental set-up, we test the effect of forced swim stress, ACI and sucrose self-administration-related stress/reward on neurotrophin gene expression.

READ-OUTS

Open field

Rats are placed in novel open field for 1 hour and allowed to explore. Behaviour is videotaped and analysed using tracking software. We analyse distance moved and time spent in the centre

Elevated plus maze

In the elevated plus-maze, rats explore during 5 min a plus-shaped arena consisting of two sheltered "closed" arms and two brighter, unsheltered "open" arms for the duration of five minutes. Closed/open arm exploration ratio is used as a parameter for anxiety.

Porsolt test

In the Porsolt test, rats placed in a cylinder filled with water (22-24°C), on day 1 for 15 min and on day 2 for 5 min. The latency to the first float and total time of floating are used as parameters of anhedonia.

Ambiguous cue interpretation test

Rats are tested in operant boxes. A positive tone (2kHz tone) signals the opportunity to gain a reward (sweetened condensed milk) by pressing the left lever (5 daily training sessions of 30 min). A negative tone (30 s) precedes (9kHz) the occurrence of an electric foot-shock (60 s at max), which can be prevented or stopped by pressing the right lever (5 daily sessions of 30-60 min). After discrimination training (criterion: 70% correct discrimination between the negative and positive tone) rats are tested for their responses to ambiguous tones with intermediate frequencies (3, 5, and 7kHz). The rats' expectations of a positive or a negative event signalled by these tones were inferred from their lever responses (6 daily sessions of 30-60 min)(Enkel et al., 2010).

Sucrose self-administration

Rats are placed in a Skinner box or touch screen operant box and are allowed to lever press during 1 hour daily sessions for sucrose pellets. When stable responding is achieved, a progressive ratio schedule is introduced, in which the animals have to respond progressively more after each sucrose reward. This schedule has been suggested to measure anhedonia (Marchese et al., 2013). Rats are not food deprived, but the food is removed from the homecage 2 hour prior to the start of the session.

The experimental groups will be as follow:

- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/- or SERT+/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (OF + EPM + FST)
- TPH2-/- or SERT-/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)

- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (ACI)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (ACI)
- TPH2+/- or SERT+/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (ACI)
- TPH2-/- or SERT-/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (Sucrose self-administration)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (molecular analysis)
- TPH2+/- or SERT+/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (sucrose self-administration)
- TPH2-/- or SERT-/- vortioxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)

- TPH2+/+ vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/+ fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2+/- vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2-/- vehicle (OF + EPM + FST)
- TPH2-/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2+/+ vehicle (ACI)
- TPH2+/+ fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2+/- vehicle (ACI)
- TPH2+/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2-/- vehicle (ACI)
- TPH2-/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2+/+ vehicle (Sucrose self-administration)
- TPH2+/+ fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2+/- vehicle (Sucrose self-administration)
- TPH2+/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2-/- vehicle (sucrose self-administration)
- TPH2-/- fluoxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)

- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/+ or SERT+/+ reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (OF + EPM + SFT)
- TPH2+/- or SERT+/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (OF + EPM + FST)
- TPH2-/- or SERT-/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(OF + EPM + FST)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (ACI)
- TPH2+/+ or SERT+/+ reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)

- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (ACI)
- TPH2+/- or SERT+/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (ACI)
- TPH2-/- or SERT-/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(ACI)
- TPH2+/+ or SERT+/+ vehicle (Sucrose self-administration)
- TPH2+/+ or SERT+/+ reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2+/- or SERT+/- vehicle (Sucrose self-administration)
- TPH2+/- or SERT+/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)
- TPH2-/- or SERT-/- vehicle (sucrose self-administration)
- TPH2-/- or SERT-/- reboxetine (10 mg/kg/daily for 21 days)(sucrose self-administration)

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

Systemic drug injections (oral gavage, i.p. or s.c.) during 21 days, once per day. The drug administration takes 5 sec-30 sec. This administration protocol is chosen because antidepressant drugs typically require chronic treatment before antidepressant effects are noted. Because behaviour itself may affect gene expression, we will use separate groups of rats for antidepressant treatment effects on gene expression, and antidepressant treatment effects on behaviour, and subsequently gene expression. We will not include a non-treated control group, in order to reduce the number of required animals. The comparison with no treatment and vehicle treatment is furthermore not of interest, because treatment (and any potential stress related to the treatment) is inherent to the antidepressant treatment.

Because behavioural tests may influence each other, and the risk of washout of drug effects increases the longer the tests take, we will employ three groups of rats for behavioural tests.

- 1: OF (open field; 1 hour); EPM (elevated plus maze; 5 min); FST (forced swim test; 15 min + 5 min) > 4 days in total
- 2: ACI (ambiguous cue interpretation; 2 hours per day; 3 weeks)
- 3: Sucrose self-administration; 1 hours per day; 3 weeks)

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

Data are analysed by two-way ANOVAs, using genotype and treatment as between subjects factor.

Group sizes will be determined using a poweranalysis. [REDACTED] we estimate group sizes at 15 per genotype.

B. The animals

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

We use the serotonin transporter (5-HTT) and tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) homozygous and heterozygous knockout rats, and their wild-type controls, to model the 5-HTTLPR and TPH2 polymorphisms, resp. We use these knockout rats as genetic models for depression (see background information).

Because gender differences play a role in the pathogenesis of depression, male and female rats will be used. Depression is approximately twice as much more prevalent in women compared to men (Seney and Sibille, 2014), male and female rats will be used. Another reason to use male and female rats is that there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying depression (Seney and Sibille, 2014). Mostly male animals are used, because of the idea that female cycle interferes with the experiment and causes a lot of variation among the animals. This appears not to be true according to a meta-analysis: Prendergast et al., 2014). Hence, the inclusion of male and female rats will provide new insight into sex differences in mechanisms involved depression-related pathology and effects of antidepressants.

We use 15 rats per genotype. We have 6 genotypes, 2 sexes, 3 sets of behavioural tests, and 6 drugs (vortioxetine/vehicle, fluoxetine/vehicle, reboxetine/vehicle). In total we need: $15 \times 6 \times 2 \times 3 \times 6 = 3240$ rats.

Because SERT KO rats will not be treated with fluoxetine, the number of 3240 rats will be reduced with $15 (n) \times 3 (SERT \text{ genotypes}) \times 2 (male/female) \times 3 (behavioural \text{ sets}) \times 2 (fluoxetine/vehicle) = 540$ rats.

3240-540 = 2700 rats are needed

The rats will be tested during adulthood, between postnatal day 70 and 140.

NB: we compare each drug to its vehicle, because in time we cannot apply all treatments simultaneously. When using a block design as for group 1 we would have to test $15 \times 3 (genotype) \times 2 (sex) \times 4 (drugs) = 360$ rats at once. Whereas it may be feasible when rats 'only' have to be injected, this will not be feasible when rats also have to be subjected to behavioural tests. It is timewise not possible to behaviourally tests so many animals on the same day (and equipment availability is also a limiting factor). If male and female rats or the three genotypes would be tested separately (scientifically not optimal, see next), we would also have too many animals for behavioural testing (180 or 120). Scientifically it is best when the drug and vehicle, the two sexes and three genotypes are tested simultaneously and not at different time points. Testing these factors at different time points is scientifically not sound, specifically because the environment at the animal facility can change (e.g. different researchers, different animal care takers, different bedding, change in food, constructions, infections, etc.). The use of a new vehicle group for each drug will pay-off when publishing the data. That is, if the experimental design is not scientifically sound, the animals have been used for nothing. With a proper scientific design we do not risk rejection of the work because of experimental design, and data acquired will - regardless of the outcome - be relevant.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat		2700	P70-P120

C. Re-use

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

REPLACEMENT: The rat is the best animal model to study human psychiatric disorders. Because of the complexity of these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as neuronal plasticity and neurotrophism, cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints.

REDUCTION: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate behavioural effects. As for the number of experimental groups present in this experiment, we will perform both protein and mRNA analyses in the same animals in order to obtain a high number of information. As depression related markers, like those investigated in the present study, are influenced by behavioural assays (e.g. Coyner J et al., 2013, Besnard A et al., 2014), we need a separate groups of behavior naïve animals to assess behavior and to perform the molecular studies.

REFINEMENT: Administration of drugs is unavoidable for answering these questions effectively. Furthermore, to measure anxiety and depression-related symptoms, the rats have to be exposed to tests employing a stressor. Moreover, the analysis we propose cannot be performed without sacrificing animals; As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during sacrifice. Only experienced researchers will administer the drugs and sacrifice the animals.

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

The rats receive daily drug injections. Handling helps to reduce injection stress. The injections have no adverse effects on the animal's health. Decapitation will be done without anesthesia, because anesthesia interferes with gene expression. Because the decapitation will be done in a fraction of a second, the rats will not suffer.
Rats are socially housed and have cage enrichment.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

n/a

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

G. Location where the animals procedures are performed

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

The rats will receive antidepressant treatment and be exposed to behavioural tests. The tests are stressful, but at the psychological level, not at the level of pain. Therefore, no pain killers will be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Drug administration is associated with mild pain. Rats are handled very well, to minimize injection pain. The rats experience psychological stress in the behavioural tests, but this is not associated with physical pain or damage.

Explain why these effects may emerge.

All antidepressant drugs have been approved by FDA for human use and therefore no adverse well-being affecting side-effects are expected.

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. In the forced swim test the rats are placed in a cylinder with water without escape possibilities. This causes substantial psychological stress. The experimenter acts within 4 seconds when the rat cannot keep its head above water. In one of the tests the rats can receive footshocks (0.5 mA, 1 sec). The footshocks are unpleasant, but not painful, and not associated with burns. The rats can escape the footshocks, although they will be exposed to the footshock during training, when they did not have yet acquired the skills to escape footshocks. Most rats acquire the ability to escape footshocks, and transgenic rats are better to do so than wild-type rats (Van der Doelen et al., 2013). In the ACI test we expect that transgenic rats bias more attention towards shock escape than to earning a reward. Finally, since rats like sucrose a lot, the sucrose self-administration paradigm is expected to be a pleasurable activity for the animals. It is expected that transgenic rats are less interested in earning sucrose.

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

Rats are socially housed with cage enrichment, which contributes to stress reduction.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

General humane endpoints will apply: Piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor coat conditions, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, red fur, elephants teeth.

Indicate the likely incidence.

< 2%

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

All homozygous (-/-) knockout rats not receiving antidepressant treatment will experience moderate stress (1/6 of all animals)

All heterozygous (+/-) and control (+/+) animals receiving vehicle or antidepressant treatment, except for those ongoing the forced swim test, will experience mild stress (3/6 of all animals)
All rats that will be subjected to the forced swim test will experience moderate stress (2/6 of all animals)

In sum:

Half of the animals (1350) will receive moderate stress
Half of the animals (1350) will receive mild stress

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

We need the rat brains to measure the molecular mechanisms by which antidepressant drug treatment + behaviour affects neurotrophins.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0029
2. Titel van het project: Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechanisms in serotonergic genetic rat models
3. Titel van de NTS: Effecten van het antidepressivum vortioxetine op hersenmechanismen in genetische diermodellen voor depressie
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 24-06-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 07-07-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 13-07-2015 tot 14-07-2015 en van 17-09-2015 tot 18-09-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 14-07-2015 en 18-09-2015
 - advies aan CCD: 28-09-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 13-07-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Niet-technische samenvatting:**
 - 3.1 De onderzoekers worden verzocht uit te leggen wat mono-aminerg is, of een andere omschrijving te kiezen.
 - 4.2, 4.3 en 4.4 Deze onderdelen zijn niet goed beantwoord. De onderzoekers worden verzocht deze onderdelen opnieuw in te vullen en beter aan te sluiten bij de toelichting.

Description of Animal Procedures:

-DAP1, onderdeel A: De onderzoeker heeft veel vehicle groepen nodig. De commissie begrijpt dat het logistiek moeilijk of onmogelijk is om alle experimenten tegelijk uit te voeren (en op die manier controlegroepen uit te sparen), maar kunt u die besparing niet bereiken door een blokdesign toe te passen? Worden voor fluoxetine en reboxetine verschillende 'vehicles' gebruikt?

-DAP1. B. De onderzoekers gebruiken zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, omdat geslachtsverschillen een rol spelen. De onderzoekers worden verzocht bij onderdeel A aannemelijk te maken dat die geslachtsverschillen inderdaad een rol spelen, bijvoorbeeld door aan te geven hoe ze naar verwachting een rol spelen (mechanisme en effecten).

- Datum antwoord: 14-07-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-3.1 Monoaminerg: er zijn 3 mono-amine neurotransmitters: dopamine, serotonine, noradrenaline. De naam mono-amine is erop gebaseerd dat deze neurotransmitters bestaan uit 1 aminozuur. Mono-aminerg betekent: dopaminerg, serotonerg of noradrenerg.

-4.2, 4.3 en 4.4 Deze onderdelen van de NTS zijn aangepast.

Description of Animal Procedures:

-DAP1, onderdeel A: Voor de decapitatie groep hebben we nu een block design voorgesteld: 3 stoffen (vortioxetine, reboxetine en fluoxetine) worden vergeleken met een vehicle (saline). Dit is praktisch wel een behoorlijke uitdaging, omdat dit design ertoe leidt dat 15 (n) x 3 (genotype) x 4 (totaal aantal stoffen) = 180 ratten tegelijkertijd geïnjecteerd moeten worden (of 360 indien we mannelijke en vrouwelijke dieren direct met elkaar willen vergelijken). Verspreiding over tijd is wetenschappelijk niet verdedigbaar, omdat over tijd de omgeving in een dierenlab kan veranderen (wisseling onderzoekers; infectie, verbouwingen, etc.). Wanneer deze veranderingen optreden zijn er meer factoren verschillend tussen groepen dan de factoren die we willen onderzoeken. Dit blockdesign voor groep 1 (decapitatie) leidt tot een reductie van 270 dieren. Dit blockdesign kan niet toegepast worden voor groep 2 (de gedragstesten), omdat het praktisch onmogelijk is om zoveel dieren tegelijkertijd gedragsmatig te testen. Het past niet qua tijd die de gedragstesten in beslag nemen.

-DAP1. B. We hebben de volgende uitleg toegevoegd: Because depression is approximately twice as much more prevalent in women compared to men (Seney and Sibille, 2014), male and female rats will be used. Another reason to use male and female rats is that there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying depression (Seney and Sibille, 2014). Mostly male animals are used, because of the idea that female cycle interferes with the experiment and causes a lot of variation among the animals. This appears not to be true according to a recent meta-analysis: Prendergast et al., 2014. Hence, the inclusion of male and female rats will provide new insight into sex differences in mechanisms involved depression-related pathology and effects of antidepressants.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 17-09-2015
- Strekking van de vragen:
De onderzoekers worden verzocht nog enkele kleine tekstuele wijzigingen door te voeren, beter uit te leggen wat de relevantie is van het beschreven onderzoek, en het ongerief als matig in te schalen voor de +/- transgene dieren die gedragstesten ondergaan zonder dat zij medicatie ontvangen en voor alle dieren die een zwemtest ondergaan.
- Datum antwoord: 18-09-2015
- Strekking van het antwoord:
De tekst is op de gevraagde punten aangepast.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- 9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
 - Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to explore whether a new multitarget monoaminergic antidepressant drug has a better efficacy'. Deze doelstelling is uitgewerkt in twee onderzoeksvragen, te weten 'how does a multitarget monoaminergic antidepressant drug, compared to mono-target reference antidepressant drugs, modulate neuroplasticity in genetic rat models for depression?' en 'what is the impact of chronic treatment with a multitarget monoaminergic antidepressant drug, compared to mono-target reference antidepressant drugs, on anxious-depressive related behavior in genetic rat models for depression?' Wetenschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de te behalen onderzoeksresultaten duidelijk zullen maken of multitarget monoaminerge antidepressiva een betere effectiviteit hebben in ratten met een genetische aanleg voor depressie vanwege uitschakeling van het SERT gen of het Tph2 gen dan monotarget monoaminerge antidepressiva. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere, wetenschappelijk onderbouwde, therapieën voor mensen met depressie waarbij de huidige therapie met monotarget monoaminerge antidepressiva onvoldoende effect heeft. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de huidige farmacotherapie bij 35% van de mensen met een

depressie niet werkt. Waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt door genetische variatie in het serotonerge systeem. Wanneer duidelijk wordt welke mensen met een depressie beter behandeld kunnen worden met een multitarget monoaminerg antidepressivum, zou dit resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het effect van multitarget monoaminerge antidepressiva op hersenen en gedrag van ratten met een genetische aanleg voor depressie.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de gedragstesten, de genetische aanleg voor depressie en de behandeling met antidepressiva. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde dagelijkse injecties i.p. of s.c. of dagelijkse orale gavage gedurende 21 dagen, de meeste gedragstesten en het doden door decapitatie in als licht. Het ongerief als gevolg van de gedwongen zwemtest en het ongerief voor de homozygote knock-out dieren die gedragstesten ondergaan maar niet behandeld worden met antidepressiva schat de commissie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 60% van de dieren en matig voor de overige dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Het effect van farmacotherapie op hersenen of gedrag kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Gedragstesten beïnvloeden de expressie van depressie-gerelateerde markers in de hersenen, waardoor de experimenten niet met minder dieren uitgevoerd kunnen worden. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 3330 ratten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De gekozen gedragstesten veroorzaken geen pijn bij de dieren. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het effect van

multitarget monoaminerge antidepressiva op hersenen en gedrag van ratten met een genetische aanleg voor depressie. Het is aannemelijk dat deze resultaten zullen bijdragen aan het gericht ontwikkelen van farmacotherapieën voor mensen met een depressie die vanwege genetische variatie in het serotonerge systeem geen baat hebben bij behandeling met monotarget monoaminerge antidepressiva. Het belang van meer inzicht in de werking van multitarget monoaminerge antidepressiva bij ratten en het beschikbaar komen van nieuwe, wetenschappelijk onderbouwde interventies voor een grote groep patiënten die geen baat heeft bij de gangbare behandeling acht de DEC substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 60% van de dieren licht ongerief en 40% van de dieren matig ongerief zal ondervinden als gevolg van de gedragstesten, de genetische aanleg voor depressie en de beschreven handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015268

Bijlagen

2

Datum 2 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015268. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

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: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: ██████████
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

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: 1 november 2015
Geplande einddatum: 1 november 2020
Titel project: Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechan
Titel niet-technische samenvatting: Effecten van het antidepressivum vortioxetine op hersenmechanismen in genetische dier
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

30 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015268

Bijlagen

2

Datum 2 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 oktober 2015

Vervaldatum: 1 november 2015

Factuurnummer: 15700268

Ordernummer: 040823-461220/2015-0029/

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015268	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB Nijmegen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD103002015268

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 04 november 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 1 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechanisms in serotonergic genetic rat models' met aanvraagnummer AVD103002015268. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project 'Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechanisms in serotonergic genetic rat models' starten. De vergunning wordt afgegeven van 04 november 2015 tot en met 01 november 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit gevoegd d.d. 28 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

In aanvulling op het DEC advies hebben wij een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Péuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Postbus: Postbus 9101
Postcode en woonplaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 04 november 2015 tot en met 01 november 2020, voor het project 'Effect of multi-target antidepressant treatment on neurotrophic and neuroplastic mechanisms in serotonergic genetic rat models' met aanvraagnummer AVD103002015268, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit. In aanvulling op het DEC advies is een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair hoofddocent. Voor de uitvoering van het project is de Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 01 oktober 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 01 oktober 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 01 oktober 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie d.d. 28 september 2015, zoals ontvangen per digitale indiening op 01 oktober 2015;

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Decapitation	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) vrouwen en mannen; SERT en Tph2 stammen; P70-P120	630	Licht
Behaviour	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) Vrouwen en mannen; SERT en Tph2 stammen; P70-P120	2700	Licht: 50% Matig: 50%

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen.

- 1) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Datum

04 november 2015

Onze referentieAanvraagnummer
AVD103002015268

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c 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 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.