

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
	NTS2015270								
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	Mail aanvullende informatie 19-10-2015				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	

06 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 10300/270
 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 [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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input 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		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie		
Afdeling		
Telefoonnummer		
E-mailadres		

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters 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 0 1 _ 1 0 _ 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 _ 1 0 _ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Toepassing van nanodeeltjes in het gericht afleveren van medicijnen in het zieke orgaan
- 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

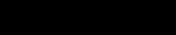
6 Ondertekening


- 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:

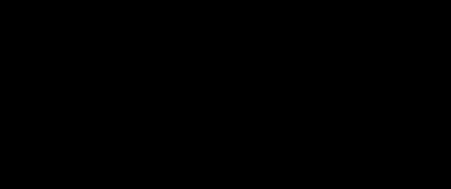
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 02 - 10 - 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. | Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery |

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.

Specific drug delivery still faces major problems today. In particular, because of the systemic administration of most drugs, these drugs will reach many organs besides the organ that needs to be treated. This often leads to many unwanted side-effects in those organs. In addition, delivery of drugs across the cell membrane into the targeted cell is still very inefficient. Therefore, a major advance in drug delivery could be reached by delivering drugs specifically to the diseased cell-type or organ, and at the same time efficiently transporting the drug across the cell membrane (1). An example is the current treatment of patients with chronic kidney diseases, which affects approximately 10% of the global population. Treatment of these patients often occurs by immunosuppressive drugs, which have a beneficial effect on the kidney, but also result in the shutdown of the systemic immune defense and a reduced resistance to infections. Therefore, patients with chronic kidney disease would particularly benefit from a specific delivery of effective drugs to the affected part of the kidney. Obviously, development of drug delivery systems that specifically target other organ- or cell-types could enhance the treatment of many more patients with other organs or cell-type-specific diseases, including patients with alzheimer, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and vascular diseases.

Cell-penetrating peptides (CPP) form a group of peptides that are 8-30 amino acids in length that mostly contain several positively charged aminoacids, and have the capability to cross cellular membranes in a non-disruptive way and without apparent toxicity (2). The uptake mechanism of CPP into the cell can involve both direct translocation and endocytotic-mediated mechanisms, depending on the circumstances (3). CPP can take along cargoes such as small molecule drugs, oligonucleotides, proteins, liposomes and polymeric particles. These cargoes can either be conjugated by covalent bond formation or by non-covalent complexation. Because of these characteristics, CPP have been considered as a potentially promising drug delivery strategy for many years (4). However, their actual application has been hampered by a lack of information about the exact uptake mechanism of each cell penetrating peptide, about its in vivo distribution, and about its cell- or organ specificity. Interestingly, a recent study on the bio-distribution of ten different CPP has demonstrated that depending on the number of arginine residues present in the peptide, CPP can show a prominent distribution to either the kidney or the liver (5). The organ-specific distribution might also be related to their ability to bind specific sugars, including glycosaminoglycans, that are present on the surface of the targeted organ or cell-type (6).

We have previously discovered that a [REDACTED] acts as a CPP (7). [REDACTED], bodily fluids, and because of its endogenous origin we considered this an especially safe CPP. In a project funded by [REDACTED],

we have recently performed several in vivo experiments using [REDACTED] (see also DEC 2012-309). Following i.v. injection of fluorescently-labeled CPP in normal mice, we found that [REDACTED] distributed prominently to the kidney. In contrast, other organs including the liver, spleen, skin, brain and heart, exhibited at least a 5-fold lower distribution of the peptide. The distribution of the peptide in the kidney was particularly localized to the [REDACTED], also called the [REDACTED]. Importantly, these [REDACTED] are the main site of inflammation in many chronic kidney diseases. We found no short-term harmful effect of [REDACTED] CPP on mice in our experiments. For nona-arginine, a widely used CPP consisting of nine arginine residues, we did not observe a prominent enrichment in the kidney. All these data fit very nicely with in vitro experiments that showed a much better uptake of [REDACTED] CPP in mouse and human [REDACTED] (and [REDACTED]) cell lines that originate from [REDACTED] in the kidney, compared to other widely-used CPP. We have now obtained strong evidence that this celspecific activity is associated with a specific receptor present in these cells from the kidney. A manuscript describing these results is currently in preparation for publication.

To proceed to an application of CPP in drug delivery, we and others have demonstrated that CPP form nanoparticulate complexes with oligonucleotides, such as siRNA, antisense oligonucleotides and mRNA (8,9). In a follow-up project, that is also funded by [REDACTED], we have now shown that [REDACTED] CPP enhance the intracellular delivery and activity of antisense oligonucleotides in [REDACTED] cell lines. In this way, we were able to effectively suppress the expression of the [REDACTED] receptor in activated [REDACTED] in vitro. [REDACTED] has been considered an important potential target in the treatment of systemic or local inflammation, since it is involved in the binding of leukocytes to [REDACTED]. In addition, we have shown that we can deliver mRNA and effectively induce protein expression in [REDACTED], using [REDACTED]. We could also demonstrate that attachment of [REDACTED] to the bio-degradable polymer poly(lactic-co-glycolic acid (PLGA) (10), which normally shows a very inefficient cellular uptake, lead to an greatly enhanced uptake of PLGA particles in [REDACTED] cell lines. This offers another very interesting possibility, since PLGA particles are FDA approved and can be loaded with small-molecular drugs without the need for covalent coupling.

In conclusion, we have demonstrated that [REDACTED] CPP distribute to the [REDACTED] of the kidney, and can effectively deliver cargoes such as oligonucleotides and PLGA particles inside these cells. The next important step would be to show that [REDACTED] CPP-containing nanoparticles can actually be used in the treatment of kidney diseases, starting with the application in mouse models.

Moreover, our results open the door to look for CPP that target other disease-related cell-types or organs. We have previously found that different membrane components, including sugars, lipids and certain receptors, determine which CPP can enter a certain celltype (unpublished results and see also ref. 3, 6 and 7). Since each celltype has its own membrane 'signature', it should be possible to design CPP that target specific celltypes in organs besides the kidney. In addition, domains linked to cellpenetrating activity, for instance stretches of multiple arginines, can be combined with domains that bind specifically to cell- or organ-specific membrane-bound sugars, receptor or other membrane components, which combines cellpenetrating activity with celspecificity. Importantly, for [REDACTED] CPP, in vitro assays could predict the in vivo behaviour of the peptide. Therefore, we can use organ-specific cell lines to pre-screen novel designed peptides and select the 'specific' CPP for further tests in animals.

(1) Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13:813-27.

(2) Foged C, Nielsen HM. Cell-penetrating peptides for drug delivery across membrane barriers. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008;5:105-17.

(3) Brock R. The uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides: putting the puzzle together. *Bioconjug Chem.* 2014;25:863-8. doi: 10.1021/bc500017t.

- (4) Farkhani SM, Valizadeh A, Karami H, Mohammadi S, Sohrabi N, Badrzadeh F. Cell penetrating peptides: efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides*. 2014;57:78-94.
- (5) Sarko D, Beijer B, Garcia Boy R, Nothelfer EM, Leotta K, Eisenhut M, Altmann A, Haberkorn U, Mier W. The pharmacokinetics of cell-penetrating peptides. *Mol Pharm*. 2010;7:2224-31. Cooper DL,
- (6) Favretto ME, Wallbrecher R, Schmidt S, van de Putte R, Brock R. Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - bystanders or active players? *J Control Release*. 2014;180:81-90.

- (8) Boisgu erin P, Deshayes S, Gait MJ, O'Donovan L, Godfrey C, Betts CA, Wood MJ, Lebleu B. Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015. pii: S0169-409X(15)00019-8.
- (9) van Asbeck AH, Beyerle A, McNeill H, Bovee-Geurts PH, Lindberg S, Verdurmen WP, H allbrink M, Langel U, Heidenreich O, Brock R. Molecular parameters of siRNA--cell penetrating peptide nanocomplexes for efficient cellular delivery. *ACS Nano*. 2013;7:3797-807.
- (10) Mohamed F, van der Walle CF. Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties. *J Pharm Sci*. 2008;97:71-87.

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?

Our main goal is to develop a novel drug delivery strategy based on cell-penetrating peptides (CPP), which targets specific organs or cell-types and locally delivers drugs for therapeutical applications.

Based on our previous results with [REDACTED] CPP, we want now to proceed to the next step, and actually apply kidney-specific drug delivery using [REDACTED] CPP in the treatment of mouse models for kidney diseases. This is part of a recently started project that is funded by [REDACTED] and is performed in collaboration with the [REDACTED]. This project is also integrated in a long-term research line [REDACTED] which is investigating the application of cell-penetrating peptides. Our department has extensive experience with the preparation and characterization of nanoparticles made from CPP, oligonucleotides and/or PLGA nanoparticles. We will use the expertise from the [REDACTED] regarding mouse models for kidney diseases. In addition, the experiments will be performed by a [REDACTED]) that has worked at the [REDACTED] and has extensive experience with multiple mouse models for kidney diseases. He has also performed the bio-distribution studies of CPP in normal mice, as described in section 3.1. The mouse models that we will use are widely accepted in the literature as appropriate models for human kidney diseases and are currently operative in the [REDACTED]. Therefore, we think this part of the project will be feasible within the suggested time-frame.

Furthermore, we want to test novel in vitro developed CPP-containing nanoparticles that target other cell-types or organs and expand our promising results to the treatment of other diseases. We have established [REDACTED] CPP as a promising drug delivery system for kidney-specific targeting, as described in section 3.1, and are currently developing novel peptides and peptide-containing nanoparticles that could potentially target other cell-types or organs. [add basis for finding other peptides] Our department has extensive experience on the development of novel cell-penetrating peptides and nanoparticles for drug delivery, which has resulted in multiple publications in high-impact journals and approved patents (see also references 6 and 8 in section 3.1). Within this part of the project, we will test the bio-distribution in normal mice of novel developed CPP, either alone, in the form of nano-particulate complexes with oligonucleotides, or attached to nanoparticles. CPP/nanoparticles that show an organ or cell-type-specific distribution will be tested for their ability to effectively deliver oligonucleotides and small molecular drugs. Subsequently, we will contact a laboratory with experience in mouse models for diseases that affect the respective cell-type or organ, and form a collaboration to investigate the application of CPP-nanoparticles in the respective mouse models. Our experience with the development of [REDACTED] CPP as a novel drug delivery system for kidney-specific targeting, has shown that we can develop and apply novel CPP within the suggested time-frame of this project.

3.3 Relevance

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

Most drugs that are currently used to combat diseases are administered systemically to patients. Therefore these drugs often have their effect not only on their desired target cell or organ, but throughout the body. This leads to many side-effects, which has a significant impact on the quality of life for the patient and an important financial impact on the healthcare system. In addition, the delivery of the desired drug inside the target cells is in most cases very inefficient. Therefore, an effective and specific targeting of drugs to diseased cell-types or organs would be a major improvement for current drug delivery strategies. During the last decade, cell-penetrating peptides (CPP) have been considered one of the most promising strategies in resolving the delivery problem. However, since CPP can supposedly cross membranes of various cell types, their use for the specific targeting of drugs has been questionable. As described in section 3.1, we have recently demonstrated that [REDACTED] CPP distribute predominantly to [REDACTED] cells in the [REDACTED] of the kidney. In this way, we have proven that certain CPP are promising for the development of novel organ-targeted therapies, such as the kidney. In this project, we want to further demonstrate the great scientific potential of CPP-based drug delivery strategies, and we will start with the application for chronic kidney diseases.

Approximately 10% of the global population suffers from chronic kidney disease (6.7% in the Netherlands), which has significantly increased in the last decades. Chronic kidney diseases often target the [REDACTED] of the kidney, also called the [REDACTED] and lead to rapid and irreversible loss of renal function. This results in kidney replacement therapies such as dialysis or kidney transplantation for many of these patients. Besides a significant negative impact on the quality of life for these patients, these treatments have a huge financial impact on the healthcare system. Drugs that are currently used to combat chronic kidney disease, including immunosuppressive drugs, have many side effects in other parts of the body. Therefore, developing a method to specifically target existing or future drugs to the kidney, would be an enormous advance for current treatment strategies. Within this project, we want to demonstrate that [REDACTED] CPP can be used to specifically and effectively deliver drugs to the [REDACTED] of the kidney, and treat well-known mouse models for human kidney diseases. For this strategy we will use a CPP that are considered as non-toxic and immunologically safe, in combination with carriers such as PLGA that are FDA-approved, as well as drugs (for instance [REDACTED] antisense oligonucleotides, cyclosporin A) that are already clinically applied without specific targeting. Therefore, a future clinical development of our

strategy for patients with chronic kidney diseases would certainly be feasible. Subsequently, we hope to use our experience with the kidney-directed drug delivery, to develop and apply novel CPP that target other organs.

3.4 Research Strategy

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

As described in section 3.2, the main goals within this project are:

- (A) To apply kidney-specific drug delivery using [REDACTED] cell-penetrating peptides (CPP) in the treatment of mouse models for kidney diseases
- (B) To test novel in vitro developed CPP-containing nanoparticles that target other cell-types or organs and expand our results to the treatment of other diseases

To obtain these goals, the project will be divided into three parts:

- (1) Determining the bio-distribution of CPP in normal mice (only B)
- (2) Determining the effective/specific delivery of drugs using CPP in normal mice (A+B)
- (3) Application of drug delivery using CPP in the treatment of mouse models for human kidney diseases (only A) For [REDACTED] peptides (goal A), we have already performed the first part, in a previous DEC application (DEC 2012-309), and therefore we will only perform part 2 and 3. For goal B, we will only perform parts 1 and 2, since we do not know to which organ future CPP will distribute. In the future, we will then apply for an amendment or new application regarding the testing of novel CPP in diseased mouse models affecting the targeted organ.

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) Determining the bio-distribution of cell-penetrating peptides (CPP) in normal mice

CPP will be selected based on in vitro assays, in which the uptake characteristics will be determined in cell lines representing different (organ-specific) celltypes. Uptake characteristics will be determined using techniques such as confocal microscopy and flow cytometry. Criteria for an appropriate CPP for in vivo use, will be: (1) a selective uptake in a limited number of celltypes; (2) the ability to effectively deliver nanoparticles and/or potential drug molecules such as oligonucleotides inside the cell; (3) no apparent toxic effects; and (4) stability in the presence of serum. that CPP that show promising results in in vitro assays in our laboratory, will be tested for their bio-distribution in mice. For this, CPP will be fluorescently labeled with Cy5.5, since the signal of the Cy5.5 label can penetrate enough through the tissue to visualize the organs. Normal mice will be injected and the bio-distribution of the fluorescently labeled CPP will be visualized in living mice using the In Vivo Imaging System (IVIS), that is already operational in [REDACTED]. Blood, urine and organs will be collected after the experiment to determine the amount of fluorescently labeled peptide that is present. Previous experiments in our lab using [REDACTED] CPP have shown that this method works very well to determine the bio-distribution of these peptides.

- (2) Determining effective and specific delivery of drugs using cell-penetrating peptides in normal mice

Eventually, CPP will be used to deliver cargoes inside specific cell-types, and these cargoes might affect the bio-distribution of the CPP. Therefore, CPP will be tested in combination with multiple cargoes, including CPP complexed with Cy5.5-labeled oligonucleotides, and CPP attached to Cy5.5 labeled nanoparticles. The bio-distribution of these complexes/nanoparticles will be analyzed in normal mice using the method described above in part 1. Here, the attached molecule, and not the CPP, will be labeled, since we previously found in our lab that the Cy5.5 label affects the binding of

the CPP to the oligonucleotide or nanoparticle. In this way we will know if the CPP can effectively deliver oligonucleotides (such as antisense oligonucleotides, mRNA or siRNA), which can later on be used for treatment, or nanoparticles, which can be filled with small molecular drugs. Preferably, the cargo will already include therapeutical molecules with a potential clinical application. For instance, we will use [REDACTED] CPP for the kidney-specific delivery of oligonucleotides and small molecular drugs, which have a high potential or are already used (in a non-targeted form) in the clinic for the treatment of chronic kidney diseases.

(3) Application of drug delivery using cell-penetrating peptides in the treatment of mouse models for human kidney diseases

To prove that cell-type or organ-specific drug delivery by CPP can actually be used for treatment, we will test CPP-containing oligonucleotide complexes or nanoparticles in relevant mouse models for human kidney diseases. For this, we will use [REDACTED] CPP that showed a specific distribution in the kidneys, in combination with drugs that have a high potential for future clinical application in the treatment of kidney diseases (as tested in part 2). We will choose established mouse models for different types of kidney diseases, and for which a specific delivery would be highly desirable. If necessary according to the literature, we will test the bio-distribution of labeled CPP-containing oligonucleotide complexes or nanoparticles in diseased mice, since kidney-specific distribution might be affected by the disease in some cases. For the treatment, we will use unlabeled CPP and unlabeled oligonucleotides/nanoparticles, since we previously found in in vitro experiments that the fluorescent label affects the treatment efficacy of the drug. Pre-diseased mice will be treated with the relevant CPP-containing oligonucleotide complexes or nanoparticles, and the effect of the treatment on disease development will be evaluated. Treatment and evaluation protocols will be performed according to methods described in the literature, and as much as possible in collaboration with the [REDACTED] that have experience using these mouse models. If necessary, a pilot experiment will be performed to determine the optimal dose for treatment for in the respective mouse model.

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

Flowchart (including go/no go points):

(1) In vitro selection of CPP: selective uptake in certain cell types + effective delivery of nanoparticles/drugs + no toxic effects + good stability in the presence of serum?

—> no: use information for future design of CPP

—> yes: in vivo tests

—> In vitro selected CPP: specific bio-distribution?

—> no: use information for future design of CPP

—> yes: proceed to part 2

(2) CPP with specific distribution: effective delivery of cargo?

—> no: end (further in vitro optimization)

—> yes: proceed to part 3 (for targeting to other organs than the kidney: apply for amendment/new application)

(3) [REDACTED] CPP containing complexes or nanoparticles with an effective cargo delivery: treatment?

—> Disease affects organ-specific distribution?

—> yes: optimize treatment protocol/dose and repeat

- > no: proceed
- > Optimal dose for treatment?
 - > no optimal dose determined: repeat
 - > optimal dose determined: proceed
- > Treatment (compared to cargo-drug without CPP): significant beneficial effect?
 - > yes: final result!
 - > no: optimize treatment protocol and repeat experiment
 - > still no beneficial effect: end (consider other CPP/drug combinations)

As described in the scheme above, we will only evaluate in part 1 the distribution of multiple cell penetrating peptides (CPP) that show the most promising results in in vitro assays using the described criteria. Only CPP that show positive results in part 1, meaning that we observe a cell-type or organ-specific bio-distribution in normal mice, will proceed to part 2 of the project. Information from part 1 will be used to optimize the in vitro development of novel CPP. In part 2, we will test if the CPP also shows its specific bio-distribution in mice when its attached to a cargo such as oligonucleotides or nanoparticles. Only CPP that still show a specific distribution in combination with the respective cargo will proceed to part 3, otherwise we will look if we can adjust the CPP/cargo formulation and test it again. In part 3, we will actually test the treatment efficacy of CPP-containing nanoparticles. First, we will evaluate if a relevant diseased mouse model exists for the targeted organ. For this, we will search for a collaboration with a laboratory that has experience with the selected mouse model. Secondly, if we have indications from the literature, or our collaborators, that the bio-distribution of the CPP/nanoparticle might be affected by the disease, we will evaluate the bio-distribution of the CPP/nanoparticle in diseased mice. If we observe a different bio-distribution compared to healthy mice, we will try to use a different treatment protocol or dose. If that is not successful, we will end the experiment for this CPP/nanoparticle. Thirdly, we will test a range of different concentrations of CPP and its cargo (= drug) based on the literature, to determine the optimal dose for treatment. When the optimal dose is determined, a larger group of mice will be treated, to determine if a beneficial effect of the CPP-containing drug can be found compared to the drug without CPP. If we find no significant beneficial effect, meaning a more efficient treatment or less side-effects caused by the drug, we will try to optimize the treatment protocol and repeat the experiment. If we still find no beneficial experiment, we will stop the experiment with the respective CPP-containing drug and evaluate if we can use the CPP in combination with other relevant drugs.

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	Determining the bio-distribution of cell-penetrating peptides in normal mice
2	Determining the effective/specific delivery of drugs using cell-penetrating peptides in normal mice
3	Application of drug delivery using cell-penetrating peptides in the treatment of mouse models for human kidney diseases

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 Determining the bio-distribution of cell-penetrating peptides in normal mice

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 animal procedures for this part of the project will consist of a single injection of a fluorescently-labeled cell penetrating peptide (CPP). The outcome parameters will be the distribution of the peptide in normal mice as detected by the In Vitro Imaging System (IVIS) in which we aim for a prominent distribution to a specific organ. Data in the literature using other cell penetrating peptides show that approximately 90% of the tested CPP show a detectable distribution in (multiple) organs, with a low variation between the mice. We will collect urine and blood after the experiment, in which we will measure the concentration of fluorescently-labeled CPP. In addition, we will study by fluorescent correlation spectroscopy if the peptide is present in blood or urine in an intact form. In this way, we can determine the proteolysis of the peptide in the blood, and the excretion of the CPP in the urine within the time-frame of our experiment. Organs will be removed after the experiment to study the bio-distribution in the respective organ in more detail by histological analysis of tissue sections. We have previously shown for ██████████ CPP, that we can accurately estimate the behavior of the fluorescently-labeled CPP in normal mice using these outcome parameters. In addition, we found in these experiments that the outcome parameters were reproducible for the same CPP between different mice.

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

The bio-distribution will be studied by a single injection of fluorescently-labeled CPP into normal mice. The dose will be based on experiments that we have previously performed. The CPP will be labeled with Cy5.5, since the signal of the Cy5.5 (far-red) label has the ability to penetrate enough through the tissue to be visualized by the In Vitro Imaging System (IVIS). The IVIS is currently operative in ██████████, and has proven to be very effective in determining the in vivo distribution of Cy5.5 labeled molecules, in the literature and in our own experience. Since IVIS measurements will be performed on live animals, mice will be put under anesthesia to prevent movements during the imaging. In this way, we can visualize the distribution in the same mouse at one or more time-points (max. 3 time-points, max. duration of the total experiment is 6 hours). When mice will be analyzed at multiple timepoints, continuous anesthesia will be used during the whole experiment to reduce discomfort of the animals. Directly after the last imaging procedure, a drop of urine and blood will be collected. Blood and urine will be collected under anesthesia, to collect enough material for analysis. Subsequently, mice will be killed and the organs will be collected for further histological analysis.

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

To statistically determine the number of mice that we need to perform these experiments, we will perform a power calculation using data from the literature and our own data from previous experiments using ██████████ CPP. We have demonstrated in those experiments that the bio-

distribution is reproducible between individual mice, and we need only a minimal number of mice. In addition, the injection will be performed by experienced personnel from the animal facility, to prevent as much as possible experimental variation due to the injection.

B. The animals

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

For these experiments, we will use mice from EU-registered breeders. We will use mice, since these are the lowest animal possible that is suitable for bio-distribution studies using our method, and for which a large array of diseased animal models is available to determine treatment efficacy in future experiments. We expect to test each peptide in at least 3 mice, and test a total of approximately 25 different peptides within the time-frame of the project. In addition, we test the most promising peptides in female and male mice from different strains and at different ages (between 6 and 52 weeks) to exclude sex-, strain- or age-related effects on the bio-distribution. For this, we expect to use 75 more mice. Therefore, we expect to use in total a maximum of $(3 \times 25) + 75 = 150$ mice for the initial evaluation of the bio-distribution of CPP. Note that we use in vitro assays to extensively screen potential interesting CPP, and only CPP that demonstrate promising results, such as a specific uptake in certain cell lines, will be used for animal experiments.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice	EU-registered breeder	150	6-52 weeks

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

Cell-penetrating peptides (CPP) will be tested extensively in in vitro assays for their characteristics and uptake in different murine and human cell lines. At this moment we cannot predict the behavior of CPP, or other molecules, in a complex organism, and therefore we are obliged to assess the bio-distribution of CPP in laboratory animals. We will use mice, since these are considered in the literature as the lowest animal species possible that still can reasonably predict the in vivo distribution in humans. Moreover, to determine the therapeutic potential of our targeted drug delivery strategy later on, we need a species of animal for which a broad range of animal models for human diseases are available. For many organs, including the kidney, mice are considered in the literature as the lowest animal species possible that still has a similar physiology compared to humans.

Reduction

Only the most promising CPP, that exhibit uptake in specific cell lines derived from human or mouse tissues, will be selected for in vivo testing. In this way, we will increase the change of success to find a organ-specific distribution in vivo. We will use data from previous experiments in our laboratory, as well as data from the literature, to optimize our experiment, which includes for instance the optimal dose and method of injection (i.v., i.p. etc.). In addition, a careful selection of the most appropriate CPP at this early stage will increase the change for success in more complicated experiments later on in this project. In the experimental procedure, the injection and IVIS analysis will be performed by experienced technicians or researchers, to reduce experimental variation caused by the injection, which will also results in a reduced number of mice needed for reproducible results.

Refinement

Mice will be exposed to as less discomfort as possible, which includes that the experimental procedures will be performed by experienced personnel. In addition, the IVIS measurements will be performed under anesthesia, to reduce the amount of stress due to constriction of the animal (since the animal is not allowed to move during the visualization).

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

Data from the literature regarding in vivo and in vitro experiments using CPP, suggest that we should not expect side-effects within the time-frame of our study (max. 6 hours). In addition, previous experiments in our laboratory using ██████████ CPP have shown no toxic side-effects in mice. We will use a dose that is based on these previous data. Nevertheless, animals will be closely monitored during the short time-span of the experiment for any discomfort. In addition, mice will be injected by qualified technicians since this is an essential part of the study. Discomfort due to

recovery from anesthesia (inhaling N2O/O2/isoflurane) cannot be reduced since anesthesia is necessary for imaging the mice with the IVIS, and for the withdrawal of blood at the end of the experiment.

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.v.t.

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.

Anesthetics will be applied via inhalation (for withdrawal of blood) at the end of the experiment by experienced personnel.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice can experience discomfort due to pain or stress. We do not expect any harmful effect caused by the injected CPP itself, also based on previous experiments that we performed.

Explain why these effects may emerge.

Adverse effects (pain, stress) on the mice can be caused by the injection, and later on by the recovery from the anesthesia. As already mentioned, we do not expect any adverse effects from the injected CPP. Based on the literature and our own experience, CPP have so far proven to be completely non-toxic, certainly within the time-frame of our experiment.

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

Mice will be injected by biotechnicians of the animal facility, with a lot of experience with animal procedures including injections. Moreover, mice will be closely monitored by the researcher during anesthesia and subsequent recovery.

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.

Humane endpoints are related to possible clinical effects caused by injection of the CPP. However, CPP have proven to be non-toxic according to the literature and our own experience. Nevertheless, mice will be closely monitored for any signs of discomfort or pain. In addition, general criteria for application of a humane endpoints will apply as mentioned below:

- 1) The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment
- 2) The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the DEC
- 3) (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment
- 4) The objective of the experiment has been reached

In case a mouse would reach one of the above mentioned humane endpoints, the mouse will be euthanatized.

Indicate the likely incidence.

Incidence < 0.1%, which is also based on previous experiments that we performed.

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).

mild

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 need to be killed to obtain the organs for histological analysis of the in vivo distribution.

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 Determining the effective/specific delivery of drugs using cell-penetrating peptides in normal mice

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 animal procedures for this part of the project will consist of a single injection of fluorescently-labeled cell penetrating peptides (CPP) in complex with cargoes, such as oligonucleotides (siRNA, antisense oligonucleotides or mRNA) or nanoparticles (PLGA particles or other polymers). The outcome parameters will be the distribution of the fluorescently-labeled complex in normal mice as detected by the In Vitro Imaging System (IVIS), in which we aim for a prominent distribution to a specific organ. Data in the literature using other cell penetrating peptides show that approximately 90% of the tested CPP show a detectable distribution in (multiple) organs, with a low variation between the mice. We expect a similar probability for complexed CPP. In a part of the experiments, we will use either complexes of CPP with mRNA encoding for luciferase, or CPP-coated PLGA particles containing luciferase mRNA. In this way, effective delivery of luciferase mRNA in the target cell/organ will result in a subsequent expression of the luciferase protein. Luciferase can then be detected by either injecting the mice with luciferin, which is converted by the luciferase enzyme to light, by adding luciferin ex vivo to tissue homogenates, or by immunohistochemistry on tissue sections using anti-luciferase antibodies. In vitro experiments in our lab have shown that this method is a very effective way to detect an effective CPP-mediated delivery of a cargo into the target tissue or cell. We will collect urine and blood after the experiment, in which we will measure the concentration of fluorescently-labeled CPP-complex. In addition, we will study by fluorescent correlation spectroscopy if the complex is present in blood or urine in an intact form. In this way, we can determine the proteolysis of the complex in the blood, and the excretion of the complex in the urine within the time-frame of our experiment. Organs will be removed after the experiment to study the bio-distribution in the respective organ in more detail by histological analysis of tissue sections. We have previously shown for [REDACTED] CPP, that we can accurately estimate the behavior of the fluorescently-labeled CPP in normal mice using these outcome parameters. In addition, we found in these experiments that the outcome parameters were reproducible for the same CPP between different mice.

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

The bio-distribution will be studied by a single injection of fluorescently-labeled CPP-complexes into normal mice. The dose will be based on experiments that we have previously performed in our lab using complexed CPP, and will also be based on the peptide concentration that was used in part 1 of the project. In this case, the complexed molecule (oligonucleotides or nanoparticles) will be labeled with Cy5.5, since a label on the CPP interferes with complexation. This is not the case when the label is attached to the oligonucleotide or nanoparticle. The signal of the Cy5.5 (far-red) label has the ability to penetrate enough through the tissue to be visualized by the In Vitro Imaging System (IVIS). In some experiments, mice that were injected with complexes of CPP with mRNA encoding for luciferase, will be injected with luciferin shortly before analysis by the IVIS. Luciferase activity will be measured by the IVIS, which can detect the conversion of luciferin into (fluorescent) light. The IVIS is currently operative in [REDACTED], and has proven to be very effective in the literature and in our own experience for determining the in vivo distribution of

Cy5.5 labeled molecules. Since IVIS measurements will be performed on live animals, mice will be put under anesthesia to prevent movements during the imaging. In this way, we can visualize the distribution in the same mouse at one or more time-points (max. 3 time-points, max. duration of the total experiment is 6 hours). When multiple time-points are used, mice will be kept under continuous anesthesia to reduce discomfort. Directly after the last imaging procedure, a drop of urine and blood will be collected. Blood and urine will be collected under anesthesia, to collect enough material for future analysis. Subsequently, mice will be killed and the organs will be collected for histological analysis.

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

To statistically determine the number of mice that we need to perform these experiments, we will perform a power calculation using data from the literature, in addition to our own data using [REDACTED] CPP from previous experiments. We have demonstrate in those experiments that the bio-distribution is reproducible between individual mice, and we need only a minimal number of mice. In addition, the injection will be performed by experienced personnel from [REDACTED], to prevent as much as possible experimental variation due to the injection.

B. The animals

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

For these experiments, we will use mice from EU-registered breeders. We will use mice, since these are the lowest animal possible that is suitable for bio-distribution studies using our method, and for which a large array of diseased animal models is available that can be used to determine the treatment efficacy in future experiments. We expect test each CPP-complex in at least 3 mice, and test a total of approximately 10 different promising CPP (from part 1 of the project) in complex with 5 different oligonucleotides/nanoparticles within the time-frame of the project. In addition, we test the most promising CPP-complexes in female and male mice from different strains and at different ages (between 6 and 52 weeks) to exclude sex-, strain- or age-related effects on the bio-distribution. For this, we expect to use 50 more mice. Therefore, we expect to use in total a maximum of $(3 \times 10 \times 5) + 50 = 200$ mice for the initial evaluation of the bio-distribution of CPP-complexes. Note that we use in vitro assays to extensively screen potential interesting CPP, and only CPP that demonstrate promising results, such as a specific uptake in certain cell lines, will be used for animal experiments.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice	EU-registered breeder	200	6-52 weeks

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

Cell-penetrating peptides (CPP), in complex with oligonucleotides or nanoparticles, will be tested extensively in in vitro assays for their characteristics and uptake in different murine and human cell lines. Moreover, we have evaluated the bio-distribution of CPP in an earlier part of this project, and therefore we will only use CPP that showed a specific distribution in vivo. At this moment we cannot predict the behavior of CPP-complexes, or other molecules, in a complex organism, and therefore we are obliged to assess the bio-distribution of complexed CPP in laboratory animals. We will use mice, since these are considered in the literature as the lowest animal species possible that still can reasonably predict the in vivo distribution in humans. Moreover, we need an animal species for which a broad range of animal models for human diseases are available, to determine the therapeutical potential of our targeted drug delivery strategy later on. For many organs, including the kidney, mice are considered in the literature as the lowest animal species possible that still has a similar physiology of the organ compared to humans.

Reduction

Only the most promising CPP-complexes, based on previous assays, will be used for in vivo testing. In this way, we will increase the change of success to also find an organ-specific distribution in vivo. We will use data from previous experiments in our laboratory, as well as data from the literature, to start with the optimal experimental protocol. This will include for instance the optimal dose and method of injection (i.v., i.p. etc.). A careful selection of the most appropriate CPP-drug complex at this early stage will increase the change for success in experiments later on in this project. In the experimental procedure, the injection and IVIS analysis will be performed by experienced technicians or researchers, to reduce experimental variation caused by the injection. This will also result in a reduced number of mice needed for reproducible results.

Refinement

Mice will be exposed to as less discomfort as possible, which includes that the experimental procedures will be performed by experienced personnel. In addition, the IVIS measurements will be performed under anesthesia, to reduce the amount of stress due to constriction of the animal (since the animal is not allowed to move during the visualization).

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

Data from the literature regarding in vivo and in vitro experiments using penetrating peptides, suggest that we should not expect side effects within the time-frame of our study (max. 6 hours). Previous experiments in our laboratory using ██████████ CPP have also demonstrated that CPP exhibit no toxic side-effects in mice. Regarding the molecules used for complexation, we expect no side effects from the oligonucleotides, since these will consist of endogenous sequences. Based on the literature we also expect no adverse effects from the nanoparticles that will be used. We will primarily use PLGA-based nanoparticles, which is FDA-approved and has already been used in several clinical applications. We will determine the dose based on these published data. Nevertheless, animals will be closely monitored during the short time-span of the experiment for any discomfort. In addition, mice will be injected by qualified technicians since this is an essential part of the study. Discomfort due to recovery from anesthesia (inhaling N2O/O2/isoflurane) cannot be reduced since anesthesia is necessary for imaging the mice with the IVIS, and for the withdrawal of blood.

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.v.t.

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.

Anesthetics will be applied via inhalation (for withdrawal of blood) at the end of the experiment by experienced personnel.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Mice can experience discomfort due to pain or stress. We do not expect any harmful effect from the injected CPP-complex itself, also based on previous experiments that we performed.

Explain why these effects may emerge.

Adverse effects (pain, stress) on the mice can be caused by the injection, and later on by the recovery from the anesthesia. As already mentioned, we do not expect any adverse effects caused by the injected CPP, or cargo (oligonucleotides or PLGA), based on the literature and our own experience.

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

Mice will be injected by biotechnicians of the animal facility, with a lot of experience with animal procedures including injections. Moreover, mice will be closely monitored by the researcher during anesthesia and subsequent recovery.

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.

Humane endpoints are related to possible clinical effects caused by injection of the CPP-complexes. However, based on our own experience and data from the literature, we do not expect any harmful effects. Nevertheless, the mice will be closely monitored for any signs of discomfort or pain. In addition, general criteria for application of a humane endpoints will apply as mentioned below:

- 1) The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment
- 2) The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the DEC
- 3) (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment
- 4) The objective of the experiment has been reached

In case a mouse would reach one of the above mentioned humane endpoints, the mouse will be euthanatized.

Indicate the likely incidence.

Incidence < 0.1%, which is also based on previous experiments that we performed.

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).

mild

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 need to be killed to obtain the organs for histological analysis of the in vivo delivery.

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 Application of drug delivery using cell-penetrating peptides in the treatment of mouse models for human kidney diseases

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.

██████████ CPP, for which we have shown a selective targeting to the ██████████ in the kidneys, will be used for drug delivery in mouse models for human kidney diseases. In collaboration with the ██████████, well-established mouse models have been selected that represent different types of human kidney diseases. In particular, human kidney diseases for which a more effective and/or targeted therapy is necessary (for instance due to unwanted side effects of the respective drug). ██████████ has extensive experience with mouse models for the human diseases systemic lupus erythematosus (mouse model: MRL/lpr mice and (NZBxNZW)F1 mice, both genetic), diabetic nephropathy (mouse model: low-dose streptozotocin-induced), ██████████ (mouse model: LPS-induced) ██████████ (mouse model: Thy1.1 transgenic mice), focal ██████████ (FSGS) (mouse model: anti-GBM-induced), ischemic renal failure (mouse model: renal artery clamping), and kidney transplant rejection (mouse model: fetal heart transplantation). As a starting point, we will use mouse models that represent different types of human kidney diseases, but which induce at maximum a moderate amount of discomfort for the animals. In addition, we will design the experimental protocol in such a way, that the duration of the induced kidney disease will be as short as possible. The models that we will use will be MRL/lpr mice, low-dose streptozotocin-treated mice, LPS-treated mice and anti-██████████-treated mice. Regarding the treatment, we will select drugs that have great potential, or are already used, in clinical applications. The experiments will always start with a pilot experiment to determine the optimal dose, by injecting a range of different concentrations of the CPP-drug complexes in the mice. Subsequently, we will test the optimal dose in a larger experimental group. For this, experimental groups will consist of (1) untreated mice, (2) conventionally treated mice (without targeting to the kidneys), and (3) mice treated with CPP-drug complexes that are targeted to the affected organs. Treatment protocols will be set-up based on the literature and in collaboration with researchers of ██████████. We will start with the delivery of ██████████ antisense oligonucleotides, for which we already showed an effective delivery in ██████████ cells by ██████████ CPP. All mouse models, which are MRL/lpr mice, low-dose streptozotocin-treated mice, LPS-treated mice and anti-GBM-treated mice, will be followed during the experiment for signs of renal failure. This will occur by urinary analysis of protein leakage (proteinuria), determined by testing a drop of urine using albumin dipsticks. At the end of each experiment urine will be collected for measuring urinary levels of KIM-1 and N-GAL (damage markers), and albumin (protein leakage). In addition, creatinin levels will be determined in plasma, and kidneys will be collected for histological evaluation of kidney damage and the glomerular influx of granulocytes/leukocytes. These renal function markers are all well-established in the literature, and functional assays are currently operative in the lab of our collaborators. For MRL/lpr mice, we will also pay attention to signs of inflammation (in for instance the skin) and immune complex deposition in the kidneys, which has been described in the literature for these models. Outcome parameters has been determined for each mouse model based on the literature and the experience of the respective researchers. To test the effect of CPP-based drug therapy in MRL/lpr mice, low-dose streptozotocin-treated mice, LPS-treated mice and/or anti-██████████-treated mice, we will aim for a two-fold decrease in ██████████ influx of granulocytes. In addition, we will aim for a significant reduction of proteinuria (>50%) in all these animal models. For MRL/lpr mice we will also aim to reduce the amount of immune complex deposits in the kidney with 50% (determined by histological analysis).

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

MRL/lpr mice have a mutation in the fas gene, which results in the spontaneous development of a lupus-like disease starting at an age of approximately 10-weeks. Animals develop severe proteinuria and renal inflammation between 17 and 20 weeks. We will treat the mice with the therapeutical drug before onset of disease, and follow them up to an age of 17 weeks (before the development of severe disease). LPS-treated C57Bl/6 mice will receive a single intraperitoneal injection of LPS, which results in (relatively mild) inflammation. Mice are then treated with the therapeutical drug, and followed during 48 hours. We will choose a dose which has been shown to induce renal inflammation, but which does not induce severe side effects. Low-dose streptozotocin-treated mice will receive an intraperitoneal injection of streptozotocin for 5 days consecutively, according to an established protocol. Mice will be fasted for 4 hours prior to injection. Mice will be tested for hyperglycemia after 4 weeks, after which treatment with the therapeutical drug will be started. In case, mice have not developed hypoglycemia after 4 weeks, streptozotocin-treatment will be repeated after 7 weeks, after which the treatment with the therapeutical drug will start. Anti-██████ treated mice will receive a single intravenous injection of rabbit anti-mouse ██████ IgG, after which animals will be treated with the therapeutical drug. Mice will be followed up to 8 days post-injection.

Regarding the treatment, a pilot experiment will be performed for each model, in which we will determine the optimal dose by injecting a range of different concentrations of CPP-drug complexes in the mice. Subsequently, mice will be injected with the optimal dose in a follow-up experiment, in which the experimental groups will consist of (1) untreated mice, (2) conventionally treated mice (without targeting to the kidneys), and (3) mice treated with CPP-drug complexes that are targeted to the kidneys. Treatment protocols will be set-up based on the literature and in collaboration with researchers that have experience with the respective kidney disease mouse model, and will consist of a single or multiple injection(s) of CPP-drug complexes (either i.p. or i.v.).

Mice will be followed during the experiment for signs of the renal function as described in section A1. The experiment will be ended at a time-point indicate above, in which case we expect for each of the model that only moderate symptoms/discomfort will be occurring, unless the animal reaches a humane endpoint (see section J2). At the end of the experiment, mice will housed overnight in metabolic cages to collect the urine, unless a human endpoint is reached before this time-point. Furthermore, at the end of the experiment, or when a humane endpoint is reached, blood will be collected (under anesthesia), and mice will be killed to collect organs for histological analysis.

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

To statistically determine the number of mice that we need to perform these experiments, we will perform a power calculation using data from the literature and data delivered by our collaborators (who have experience with the respective kidney disease mouse model, as mentioned above). In our calculations, we will take along mice that might be lost from the experimental groups due to unexpected early development of disease symptoms. In addition, the injection will be performed by experienced personnel from ████████, to prevent as much as possible experimental variation due to the injection.

B. The animals

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

For these experiments, we will use mice from EU-registered breeders. Mice will be used, since this is the lowest animal species possible that has a similar kidney physiology to humans. In addition, for mice a large array of animal models for human kidney diseases is available to test treatment efficacy. Mice from different strains and at different ages will be used (between 6 and 52 weeks), depending on the selected kidney disease mouse model (as described in section A). The choice of our kidney mouse model, for application of our specific CPP-directed drug delivery, is based on the literature and in consultation with researchers that have extensive experience with the selected mouse models. We will use both male and female mice for the different models, except for the MRL/lpr and (NZBW)F1 mice since in these mice disease development occurs predominantly in the female mice (as is the case in the human disease). Therefore, we will use only female mice for these models. We expect to test the delivery of a maximum of 5 different drugs using the optimum delivery strategy as determined in vitro. For each drug delivery strategy, we will test a maximum of 3 appropriate kidney disease mouse models, either MRL/lpr mice, LPS-treated mice, low dose streptozotocin-treated mice, or anti-██████-treated mice. The of the model depends on the therapeutical drug we chose for kidney-specific delivery. We will determine the optimal dose for each treatment in a pilot experiment, for which we estimate to need a maximum of 100 mice. Based on the available experience with mouse models for chronic kidney diseases, we will be using treatment groups of approximately 10 mice. The exact number of mice will be determined for each mouse model using the appropriate statistical methods. We estimate that we will need a maximum of: 5 drug delivery strategies x 3 models x 10 mice x 3 groups (that is non-treated, conventional treatment and CPP-directed treatment) = 450 mice. To repeat some of the experiments, we expect to need a maximum of 200 extra mice. Therefore, in total we expect to need $100+450+200 = 750$ mice.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice	EU-registered breeder	750	6-52 weeks

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

We will only use cell-penetrating peptides (CPP) that have shown a specific bio-distribution, and an effective delivery of cargo/drugs to the targeted organ, as determined in part 1 and 2 of this project. In this way, we will increase the chance of success when we apply these CPP for treatment in the respective mouse models. At this moment we cannot predict the behavior of complexed CPP, or other molecules, in a complex healthy organism, or during disease, and therefore we are obliged to assess the treatment potential of our CPP. We will use mice, since these are considered in the literature as the lowest animal species possible that still has a similar physiology of the kidneys compared to humans. Moreover, we need an animal species for which a broad range of animal models are available to determine the therapeutical potential of our targeted drug delivery strategy. The mouse models that we have chosen, represent well established models for different types of human kidney diseases. The experimental protocol for the selected models, we will be designed in such a way that the experiment will be terminated before mice develop severe signs the respective kidney disease.

Reduction

Only the most promising CPP-complexes will be used, which have shown a specific bio-distribution, and an effective delivery of cargo/drugs to the kidneys. We will use data from our previous experiments, as well as data from the literature, to start with the optimal treatment protocol, which includes for instance the optimal dose and method of injection (i.v., i.p. etc.). We also determine the optimal dose for our CPP-drug complex in a preliminary experiment. In addition, collaboration with researchers that already used the respective mouse models, will increase the chance of a successful experiment, and reduce the number of mice. In the experimental procedure, the injection will be performed by experienced technicians or researchers, to reduce experimental variation caused by the injection. This will also result in a reduced number of mice needed for reproducible results.

Refinement

Mice will be exposed to as less discomfort as possible, which includes that the experimental procedures will be performed by experienced personnel. In addition, treatment protocols will be designed in collaboration with qualified personal, to reduce discomfort due to the treatment. However, we cannot completely prevent discomfort, since we need to assess the therapeutically efficacy of our treatment in comparison with the non-targeted, and therefore non-ideal, treatment. The development of a specific drug-delivery strategy can also be considered as an effort to refine experiment, since a lower dose of the specifically targeted drug might be used in future experiment. This would result in less side-effects and less discomfort for the mice. Note that we will use biodegradable nanoparticles that have no negative environmental effect. Therefore, disease development for each mouse model will only be progressed until the appearance moderate signs of disease (mild proteinuria, no severe signs of systemic inflammation,

animals are still active), based on previous experiments. In addition, mice will be regularly screened for disease symptoms, also in collaboration with researchers that have experience with respective mouse models.

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

As already described in the animal procedures 1 and 2, we will use a concentration of CPP for which we expect no harmful effects based on the literature and on our own experience. The dose of the drugs that we will apply in combination with the respective CPP, will be chosen based on the literature and/or in collaboration with researchers who have already used this drug in kidney disease animal models. In addition, we will determine the dose of our CPP-drug complex in preliminary experiments. If available, we will select drugs for CPP-directed targeting to the kidneys, that have already been proven effective in the reduction of disease symptoms in mice and/or humans, but show a inefficient delivery or side-effects. In that way, we expect an improved efficacy of the selected drugs with reduced side-effects. We have chosen mouse models, which are the best available established mouse models for these kidney diseases. Importantly, we will design the experimental protocol in such a way that the selected animal models will experience discomfort that is moderate at maximum. For instance, MRL/lpr mice will only be followed until an age of 17 weeks, before onset of severe disease. LPS-treated mice will be followed up to 8 hours after the experiments, since this is a acute model, using a concentration of LPS which does induce severe side effects. For streptozotocin-treated mice, we will use a low dose that has been shown to induce diabetic kidney disease without severe side effects. The experimental protocol for anti-██████-treated mice is optimized for this batch of anti-██████ IgG, and does not lead to severe discomfort within the time frame of the experiment. Mice will be injected by qualified technicians, since this is an essential part of the study. In addition, mice will be closely monitored during the experiment for signs of disease development, which will take place in close collaboration with qualified personnel that has experience with respective mouse model. In experiments where mice have to be solitary housed in a metabolic cage, we will decrease stress by adding cage enrichment such as a nesting box.

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.v.t.

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.

Anesthetics will be applied via inhalation (for withdrawal of blood) at the end of the experiment by experienced personnel.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice can experience discomfort due to pain or stress, and due to development of the disease that accompanies the selected mouse models. These include systemic inflammation (MRL/lpr mice, LPS-treated mice, and anti-██████-treated mice), hypoglycemia (streptozotocin-treated mice) and reduced renal function (all models). As mentioned earlier, the experimental protocol will be designed in such a way that the experiment will be terminated before onset of signs of severe discomfort. However, we cannot completely exclude the possibility that individual mice develop severe disease earlier as expected. In some experiments, mice will experience stress due to solitary housing. We do not expect any harmful effect from the injected CPP-complex itself, also based on previous experiments that we performed. In fact, our goal is to treat the mice and reduce disease symptoms.

Explain why these effects may emerge.

Adverse effects (pain, stress) on the mice can be caused by the injection, and later on by the recovery from anesthesia. In addition, in some experiments stress can be caused by solitary housing in metabolic cages. Adverse effects can also be caused by development disease symptoms, which include a decrease in renal function resulting in protein leakage in the urine, weight-loss, decreased activity, or inflammation of the kidney (and other organs in the case of a systemic inflammation). In the case of MRL/lpr mice, spontaneous development of lupus-like disease results in the deposition of immune complexes in the kidney. In anti-██████-treated mice, injection of anti-██████ results in binding of IgG in the kidney, resulting in local inflammation. LPS-treated mice develop a systemic inflammation by the injection of LPS, which on the short term leads (mostly) to renal inflammation. Streptozotocin-treated mice develop hypoglycemia, resulting in diabetes-like symptoms that include diabetic nephropathy with inflammatory reactions in the kidney. Note that we will ensure that the experimental protocols for the diseased mouse models that we use for therapeutic application of CPP-complexes, will ensure that have at maximum a moderate discomfort. As already mentioned, we do not expect any adverse effects caused by the injected CPP or therapeutic/cargo based on the literature and our own experience.

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

Mice will be injected by biotechnicians of the animal facility, who have much experience with animal procedures including injections. Moreover, mice will be closely monitored by the researcher during anesthesia and subsequent recovery. The experimental protocol will be designed in such a way that each mouse models will experience maximally a moderate discomfort during the experiment. In streptozotocin-treated mice, blood sugar levels will be checked and, if necessary mice will be supplied with 10% sucrose water. Renal function will be monitored regularly by testing a drop of urine

for leakage of albumin using albumin sticks. For mice that experience an albuminuria > 1 g/l, the experiment will be stopped. In addition, each experiment will be performed in close collaboration with personnel that has experience with the respective mouse model, and can help us to optimally design our experiment and according treatment protocol. Also note that our goal is to treat the diseased mouse and reduce discomfort due to diseased symptoms. If available, we will select drugs for CPP-directed targeting to the kidneys, that have already been proven effective in the reduction of disease symptoms in mice and/or humans, but showed side-effects or an inefficient delivery. In that way, we expect that we can use a lower dose because of the targeting and thereby reduce side-effects.

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.

Humane endpoints are related to clinical effects caused by development of the kidney disease in the mice. Spontaneous, or induced development of kidney disease in mouse models leads to (moderate) signs of disease as described in section I). The main humane endpoint for all four mouse models will be severe proteinuria (> 1 g/l, as determined by testing a drop of urine using albumin dipsticks) over several days. In addition, apathetic behavior, decrease in eating/drinking or weight loss will be additional endpoints. For MRL/lpr mice, and LPS-treated mice, development of (severe) systemic inflammation (for instance in the skin or joints) will also be considered as an additional endpoint. In streptozotocin-treated mice, blood sugar levels will be checked in case of severe hypoglycemia over a long period, the experiment will be stopped. The researcher who performs the experiments has extensive experience with several of these mouse models, and the evaluation of renal function and discomfort of the mice due to disease symptoms. Importantly, the experimental protocol is designed to ensure that the selected kidney disease models will maximally experience a moderate discomfort. When any of the adapted criteria for humane endpoints are observed, or any of the general criteria for application of a humane endpoints mentioned below, mice will be euthanized. In this case, mice will not be housed in metabolic cages at the end of the experiment.

General criteria for application of a humane endpoints mentioned below:

- 1) The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment
- 2) The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the DEC
- 3) (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment
- 4) The objective of the experiment has been reached

Indicate the likely incidence.

As mentioned above, the experimental protocol will be designed in such a way that severe disease symptoms (leading to a humane endpoint) should not develop, and mice will be killed before the onset of severe disease symptoms. However, since we can not completely exclude the appearance of

severe disease symptoms in individual mice, we expected an incidence of a humane endpoints (based on our own experience) of 20% (MRL/lpr), 20% (LPS-treated mice), 10% (streptozotocin-treated mice), and 15% (anti-██████-treated mice).

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).

mild (anesthesia, injection)
moderate (disease-related symptoms, metabolic cages)

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 need to be killed to obtain the organs for histological analysis of the development of the disease in non-treated and treated animals.

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 2015-0034
2. Titel van het project: Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery.
3. Titel van de NTS: Toepassing van nanodeeltjes in het gericht afleveren van medicijnen in het zieke orgaan.
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
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 13-04-2015
 - anderszins behandeld: herbespreking in DEC-vergadering op 02-06-2015
 - termijnonderbreking(en) van 20-04-2015 tot 21-05-2015 en van 28-07-2015 tot 28-08-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 21-05-2015 en 28-08-2015
 - advies aan CCD: 02-10-2015
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: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen:
Niet-technische samenvatting:
 - Deze niet-technische samenvatting is te lang, mede door de vele herhalingen, en bevat een veelheid aan stijl- en spelfouten. De onderzoekers worden verzocht de lengte aan te passen conform de richtlijnen van de CCD en tevens op zinsbouw en spelling te letten.**Project Proposal:**
 - 1.3 en 3.1. In de titel wordt gesuggereerd dat de onderzochte peptides op eigen kracht de celwand penetreren, zonder actieve bijdrage hieraan van de betreffende cellen. Kunnen de

beschreven peptides werkelijk op eigen kracht de celwand penetreren, of is dit een endocytose-gemedieerd proces? De onderzoekers worden verzocht het proces van opname door de cel nader toe te lichten, en zondig de terminologie aan te passen.

-3.1. Op basis van welke bevindingen denken de onderzoekers dat er mogelijk peptides bestaan die specifiek worden opgenomen door endotheelcellen van andere organen dan wel specifiek ██████████ penetreren van andere organen? Zij worden verzocht dit beter toe te lichten.

-3.4 strategie B. Op grond van welke criteria selecteren de onderzoekers peptides om te testen in dierexperimenten? Indien er een in vitro stap vooraf gaat aan deze dierproeven, verzoekt de commissie de onderzoekers deze stap te beschrijven en nauwkeurig aan te geven op grond van welke criteria peptides geselecteerd zullen worden voor het bepalen van de bio-distributie in muizen. De commissie vindt het belangrijk dat deze afweging zorgvuldig gebeurt.

-3.4 strategie B. De beoogde diermodellen voor een humane ziekte zijn nog niet bekend, waardoor de DEC geen goede ethische afweging kan maken over dit deel van de projectaanvraag. Zij verzoekt de onderzoekers dan ook deze stap uit strategie B te verwijderen. Indien de onderzoekers te zijner tijd zullen kiezen voor een diermodel voor een specifieke humane ziekte, kunnen zij via een wijziging op deze projectaanvraag of een nieuwe projectaanvraag toestemming vragen voor dergelijke dierexperimenten. Zij worden verzocht deel 3 toe te spitsen op het nierziektemodel. Mits de selectie van peptides voldoende wordt onderbouwd, kunnen deel 1 en 2 wel uitgevoerd worden met nieuw te ontwikkelen peptides.

Description of Animal Procedures:

-Dierproef 1 en 2. A, tweede vraag. In het huidige experiment wordt de muis driemaal onder anesthesie gebracht binnen 6 uur. Waarom gebruiken de onderzoekers geen langdurige anesthesie waardoor het een terminaal experiment wordt met minder ongerief voor de dieren? Zij worden verzocht dit aan te passen dan wel toe te lichten waarom zij herhaalde anesthesie willen toepassen.

-Dierproef 3. De onderzoekers worden verzocht dit uitsluitend voor het nierziektemodel te beschrijven.

- Datum antwoord: 18-05-2015

Niet-technische samenvatting:

- Wij zijn ons bewust van de adviserende richtlijnen van de CCD betreffende de lengte van de niet-technische samenvatting (namelijk ongeveer 500 woorden, met uitzondering van de vragen). In het gewijzigde projectvoorstel hebben we daarom de lengte van de tekst ingekort van ongeveer 1500 naar 660 woorden. Verder bieden wij onze excuses aan voor enkele spel- en taalfouten in de niet-technische samenvatting, welke zijn gecorrigeerd in de gewijzigde aanvraag.

Project Proposal:

- 1.3 en 3.1- Wij begrijpen dat de commissie de term “celpenetrerende peptides” mogelijk verkeerd heeft geïnterpreteerd. Wij suggereren hiermee niet dat de peptides op eigen kracht de celmembraan passeren, en dat de cel hier geen actieve bijdrage aan levert. Sinds ongeveer 20 jaar wordt deze term binnen de wetenschappelijke wereld gebruikt voor peptides die de celmembraan makkelijk kunnen passeren en daarbij hun “vracht”

meenemen (waaronder RNA, DNA en eiwitten). Het mechanisme waarmee celpenetrerende peptiden de cel binnen dringen is de afgelopen tientallen jaren uitgebreid onderzocht. Onder andere de afdeling [REDACTED], heeft hierin een vooraanstaande rol gespeeld. Uit dit onderzoek is gebleken dat celpenetrerende peptiden zowel via directe translocatie als endocytose het celmembraan kunnen passeren. Dit is afhankelijk van het celpenetrerende peptide, maar ook van de concentratie van het peptide, het celtype en de getransporteerde vracht. Bovendien kan eenzelfde celpenetrerend peptide switchen tussen de verschillende mechanismen, afhankelijk van de omstandigheden. In beiden processen (directe translocatie en endocytose) spelen zowel het peptide als de cel een actieve rol. Dit gebeurt onder andere door binding aan specifieke suikers, vetzuren of eiwitten op het celmembraan (door het peptide), en het herrangschikken van moleculen in het celmembraan en/of rekrutering van signaal moleculen (door de cel). Meer informatie kunt u onder andere lezen in referentie 2 van onderdeel 3.1 van het projectvoorstel, of op Wikipedia (http://en.wikipedia.org/wiki/Cell-penetrating_peptide). Ter verduidelijking hebben wij in onderdeel 3.1 van het projectvoorstel de volgende zin toegevoegd: "The uptake mechanism of CPP into the cell can involve both direct translocation and endocytotic-mediated mechanisms, depending on the circumstances.". Verder hebben we een recent review artikel van [REDACTED] als referentie toegevoegd [REDACTED]

-3.1. Wij zijn het eens met de commissie dat het moeilijk te voorspellen is, of er peptiden bestaan die specifiek worden opgenomen door endotheelcellen (of andere celtypes) in andere organen. Aan de andere kant staan celpenetrerende peptiden juist bekend om het feit dat ze heel goed allerlei verschillende celtypes binnen kunnen gaan. Op dit moment wordt er echter weinig onderzoek gedaan naar de celspecificiteit, en het daarbij behorende opname mechanisme, van de verschillende celpenetrerend peptiden. Wel is er een vrij recente publicatie (Sarko et al., ref. #5 in onderdeel 3.1 van de gewijzigde aanvraag) die laat zien dat er een duidelijk verschil is in de biodistributie van een tiental bekende celpenetrerende peptiden naar de nieren en lever, maar ook milt, longen, hart en darmen. Verder weten we uit eigen onderzoek dat suikers aan de buitenkant van de cel, en de compositie van het membraan, bepalen of een bepaald celpenetrerend peptide wordt opgenomen in het desbetreffende celtype (o.a. beschreven in ref. 3, 6 en 7 in onderdeel 3.1 van de gewijzigde aanvraag). Dat heeft ons er oorspronkelijk toe gebracht om de celspecificiteit *in vitro* en *in vivo* nader te onderzoeken. Door verschillende celpenetrerende peptiden op orgaanspecifieke cellijnen te testen, hebben we gevonden dat celpenetrerende peptiden afgeleid van [REDACTED] uitermate geschikt zijn om nierspecifieke cellen (en dan vooral cellen uit het [REDACTED] te targeten. Deze resultaten hebben we vervolgens kunnen bevestigen in *in vivo* experimenten in muizen. Op dit moment zijn we het precieze opname mechanisme van deze peptiden aan het onderzoeken, maar het lijkt erop dat naast het celpenetrerende activiteit er ook een binding aan een specifieke receptor plaatsvindt. We weten uit eigen resultaten dat het specifieke opname mechanisme van een celpenetrerende peptide afhangt van zowel de karakteristieken van het peptide, als het celtype. Bovendien kunnen eiwitdomeinen die een celpenetrerende activiteit bevatten, zoals enkele dichtopeenvolgende arginines, makkelijk gecombineerd worden met een bekend

aminozuursequentie die bindt aan een cel- of orgaanspecifieke suiker of receptor. Daarom denken wij dat het mogelijk moet zijn om celpenetrerende peptiden te ontwikkelen die specifiek zijn voor andere celtypes of organen, naast het [REDACTED]. Wij hebben onderdeel 3.1 (Background) nu uitgebreid met deze informatie.

-3.4 strategie B. Uiteraard zullen wij een zorgvuldige afweging maken over welke celpenetrerende peptiden we uiteindelijk zullen gebruiken in dierexperimenten. Onze afdeling heeft een ruime ervaring in het ontwikkelen van nieuwe celpenetrerende peptiden en het testen in verschillende *in vitro* assays. Hierbij worden peptiden toegevoegd aan cellijnen afkomstig uit verschillende organen, en worden de opname eigenschappen bepaald m.b.v. confocale microscopie en flowcytometrie. Criteria voor een celpenetrerend peptide geschikt voor *in vivo* gebruik, zullen zijn: (1) een selectieve opname in een beperkt aantal celtypes; (2) capaciteit om effectief nanopartikels en/of potentiële medicijnmoleculen af te leveren; (3) geen zichtbaar toxisch effect; (4) en stabiliteit in aanwezigheid van serum. Zoals al eerder vermeld, hebben we de selectieve targeting van cellen in het [REDACTED] door [REDACTED] celpenetrerende peptiden, ook gevonden door verschillende celpenetrerende peptiden te testen op allerlei cellijnen. Het is belangrijk te vermelden dat de *in vitro* resultaten voorspellende waarden hadden voor de *in vivo* distributie van deze peptiden in muizen. We hebben de *in vitro* assays en bijbehorende criteria toegelicht in onderdeel 3.4 van de gewijzigde aanvraag.

-3.4 strategie B. Wij begrijpen dat het moeilijk is voor de DEC om een goede afweging te maken, wanneer de toekomstige diermodellen nog niet bekend zijn. Daarom hebben wij deze stap uit strategie B verwijderd, en onderdeel 3 toegespitst op muizenmodellen voor nierziekten. De zorgvuldige selectie van peptiden is verder onderbouwd in de gewijzigde aanvraag (zie ook antwoord bij de vorige opmerkingen).

Description of Animal Procedures:

-*Dierproef 1 en 2. A, tweede vraag.* Wij het protocol aangepast in de gewijzigde aanvraag, en zullen een langdurige anesthesie toepassen.

-*Dierproef 3.* Wij hebben dit onderdeel in de gewijzigde aanvraag uitsluitend gericht op de nierziektmodellen.

- Datum: 28-07-2015

Strekking van de vragen:

In bijlage 3 ontbreekt een concrete beschrijving van de diermodellen voor nierfalen die de onderzoekers willen gebruiken om hun nieuwe geneesmiddelafgifte systeem in te testen. Zij worden verzocht dit toe te voegen aan de aanvraag.

- Datum antwoord: 28-08-2015

Strekking van de antwoorden:

Naar aanleiding van uw commentaar hebben wij het onderdaal DAP-3 van onze aanvraag op een aantal punten gewijzigd. Hierbij is een meer gedetailleerde omschrijving van de diermodellen toegevoegd, inclusief aanvullende informatie over de benodigde handelingen, uitleesparameters en keuzecriteria. Onze excuses voor het ontbreken hiervan. Wij zijn het volledig met de DEC eens, dat deze informatie essentieel is om de aanvraag goed te kunnen beoordelen.

Verder hebben wij e.e.a. duidelijker opgeschreven, aangezien wij begrepen dat dit niet duidelijk was overgekomen bij de DEC. In de aanvraag hebben wij het over diermodellen

voor een zestal ziekten (bij mensen), waarvoor al ervaring bij de ██████████ bestaat. Wij hebben nu ook de desbetreffende diermodellen voor iedere humane ziekte toegevoegd. Verder noemen wij later dat we per behandeling drie modellen uitkiezen die het best geschikt zijn voor die behandeling. Waarmee we niet bedoelen dat we maar drie modellen in het totaal zullen gebruiken. Ook dit hebben we nu wat duidelijker proberen op te schrijven.

- 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 develop a novel drug delivery strategy based on cell-penetrating peptides, which targets specific organs or cell-types and locally delivers drugs for therapeutical applications'. De te behalen onderzoeksresultaten zullen resulteren in de identificatie van celpenetrerende peptides die specifiek ophopen in bepaalde organen, en in de evaluatie van therapie op basis van celpenetrerende peptides die zorgen voor nierspecifieke medicijnafgifte in een nierziektemodel. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van nieuwe methoden om medicijnen gericht af te leveren in een doelorgaan waardoor patiënten mogelijk minder last van bijwerkingen van deze medicijnen zullen hebben.
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 met de ontwikkeling van celpenetrerende peptides en biodistributie experimenten. Voor de proeven met diermodellen voor nierziekten wordt nauw samengewerkt met onderzoeksgroepen die hier veel ervaring mee hebben. De proeven volgen logisch op elkaar. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de ontwikkeling van nieuwe celpenetrerende peptides die specifiek ophopen in bepaalde organen van muizen, en het effect van therapie met celpenetrerende peptides die zorgen voor nierspecifieke medicijnafgifte in een nierziektemodel in muizen.
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 de meeste dieren realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de muizen wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de injectie van celpenetrerende peptides en de inductie van een nierziekte met de daarop volgende behandeling. De DEC schat het ongerief als gevolg van de injecties met medicijnen of celpenetrerende peptiden (al dan niet gekoppeld aan medicijnen) en het kortdurend verblijf in een metabole kooi in als licht. Het ongerief als gevolg van het imageren onder anesthesie is minimaal. Het ongerief voor de dieren die een nierziekte ontwikkelen (dierproef 3) als gevolg van genetische aanleg, een injectie met LPS, meerdere injecties met streptozotocine of een injectie met anti-██████ antistoffen schat de commissie in als matig voor de meeste dieren (ongeveer 85% van de behandelde dieren). Een minderheid van de behandelde dieren (ongeveer 15%) zal ernstige ziekteverschijnselen ontwikkelen en een humaan eindpunt bereiken. De commissie schat het ongerief voor deze dieren in als ernstig, waarmee zij dus afwijkt van de beschreven inschatting van het ongerief in de aanvraag. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is volgens de DEC licht voor 30% van de muizen, matig voor 60% van de muizen en ernstig voor 10% van de muizen.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Een deel van het project wordt in vitro uitgevoerd, voor het andere deel 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. De biodistributie en afbraak van de celpenetrerende peptide-complexen kan alleen goed in vivo worden onderzocht, waarvoor dieren nodig zijn die qua fysiologie voldoende op mensen lijken. De onderzoekers kiezen voor muizen omdat er voldoende orgaanspecifieke ziektemodellen in dit dier zijn.
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. De verschillende dierexperimenten volgen logisch op elkaar, en resultaten uit eerdere experimenten worden gebruikt bij de opzet van daarop volgende experimenten. Door het inbouwen van go/no go momenten op basis van heldere criteria wordt voorkomen dat onnodige dierexperimenten worden uitgevoerd. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1100 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 biodistributie-experimenten vinden plaats onder terminale anesthesie, zodat de dieren geen ongerief ervaren door het ontwaken uit de anesthesie. De dieren waarbij een nierziekte wordt geïnduceerd worden regelmatig gecontroleerd op ziekteverschijnselen, en druppels van hun urine worden regelmatig onderzocht op ernstige proteïnurie. Op die manier kunnen zieke dieren in een vroeg stadium van nierziekte op humane wijze gedood worden om onnodig lijden van de dieren te voorkomen. 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 inzichten verkregen in het therapeutische effect van celpenetrerende peptide-complexen die zorgen voor nierspecifieke medicijnafgifte in nierziektomodellen bij muizen, en worden nieuwe celpenetrerende peptides geïdentificeerd die specifiek ophopen in bepaalde organen. Het is aannemelijk dat dit inzicht kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe methoden om medicijnen gericht in een doelorgaan af te leveren. Veel medicinale therapieën veroorzaken bijwerkingen doordat een systemisch toegediend medicijn niet alleen een effect heeft op het doelorgaan, maar ook op andere (niet aangedane) organen. Wanneer dergelijke medicijnen specifiek in het doelorgaan kunnen worden afgeleverd, zal de kans op bijwerkingen vanwege een effect in andere organen aanzienlijk afnemen. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 60 % van de muizen matig ongerief en 10 % van de muizen ernstig ongerief zal ondervinden als gevolg van de nierziekte die eerst wordt geïnduceerd en vervolgens behandeld. Voor 30% van de muizen blijft het ongerief beperkt tot licht. 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

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 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
AVD103002015270

Bijlagen

2

Datum 6 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015270. 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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
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 verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

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 oktober 2015
Geplande einddatum: 1 oktober 2020
Titel project: Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery
Titel niet-technische samenvatting: Toepassing van nanodeeltjes in het gericht afleveren van medicijnen in het zieke orgaan
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
- brief factuur

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

2 oktober 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen



Postbus 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
AVD103002015270

Bijlagen

2

Datum 6 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 6 oktober 2015

Vervaldatum: 5 november 2015

Factuurnummer: 15700270

Ordernummer: kostenplaats en kostensoort: 040823-461220, CDL

projectnummer: 2015-0034, Verantwoordelijk onderzoeker: 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015270	€ 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: maandag 19 oktober 2015 10:57
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD103002015270

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte CCD,

Hieronder het antwoord van de onderzoeker op uw aanvullende vraag. De DAP is aangepast en stuur ik via net FTP.

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. In de bijlages dieproeven 1 en 2 heeft u geschreven beide geslachten te kunnen gebruiken. Kunt u toelichten of het mogelijk is in dierproef 3 dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

In dierproef 3 kunnen we muizen van beide geslachten voor de beschreven muizenmodellen gebruiken. Uitzondering zijn de muizenmodellen voor SLE (MRL/lpr model en (NZBW)F1 model), waarbij net als bij de humane ziekte, de ziektesymptomen voornamelijk bij de vrouwelijke muizen voorkomen. Hierdoor zullen wij voor deze modellen alleen vrouwelijke muizen gebruiken.

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: vrijdag 16 oktober 2015 14:48
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvullende informatie aanvraag AVD103002015270

Geachte [REDACTED]

Op 2 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery" met aanvraagnummer AVD103002015270. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. In de bijlages dieproeven 1 en 2 heeft u geschreven beide geslachten te kunnen gebruiken. Kunt u toelichten of het mogelijk is in dierproef 3 dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP of per post. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Om u aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken, ontvangen we graag uw antwoord uiterlijk dinsdag 20 oktober 2015.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen

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,



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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Tav. [REDACTED]

Postbus 9101
6500HB 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
AVD103002015270

Uw referentie

Bijlagen

1

12 NOV. 2015

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery" met aanvraagnummer AVD103002015270. 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 "Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 november 2015 tot en met 1 oktober 2020. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Op 19 oktober heeft u uw aanvraag aangevuld na vragen van de CCD.

Op 3 november 2015 heeft u een herziene bijlage dierproeven 3.4.4.3 en NTS gestuurd omdat de DEC het ongerief van de dieren hoger heeft geclassificeerd en de CCD deze classificatie heeft overgenomen.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 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. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. De CCD neemt in de vergunning een algemene voorwaarde op. Deze voorwaarde wordt gesteld bij langjarige projectvergunningen om te voldoen aan datgene wat voortkomt uit artikel 10 van de wet.

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

Beoordeling achteraf

De CCD volgt het advies van de DEC om het ongerief van de dieren uit bijlage 3.4.4.3 te classificeren als matig (85%) en ernstig (15%). Door de ongerief classificatie ernstig is voor uw project een beoordeling achteraf vereist, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1d en lid 3 van de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.



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.

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.

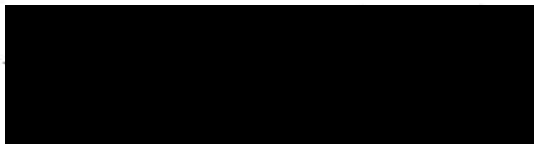
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

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:



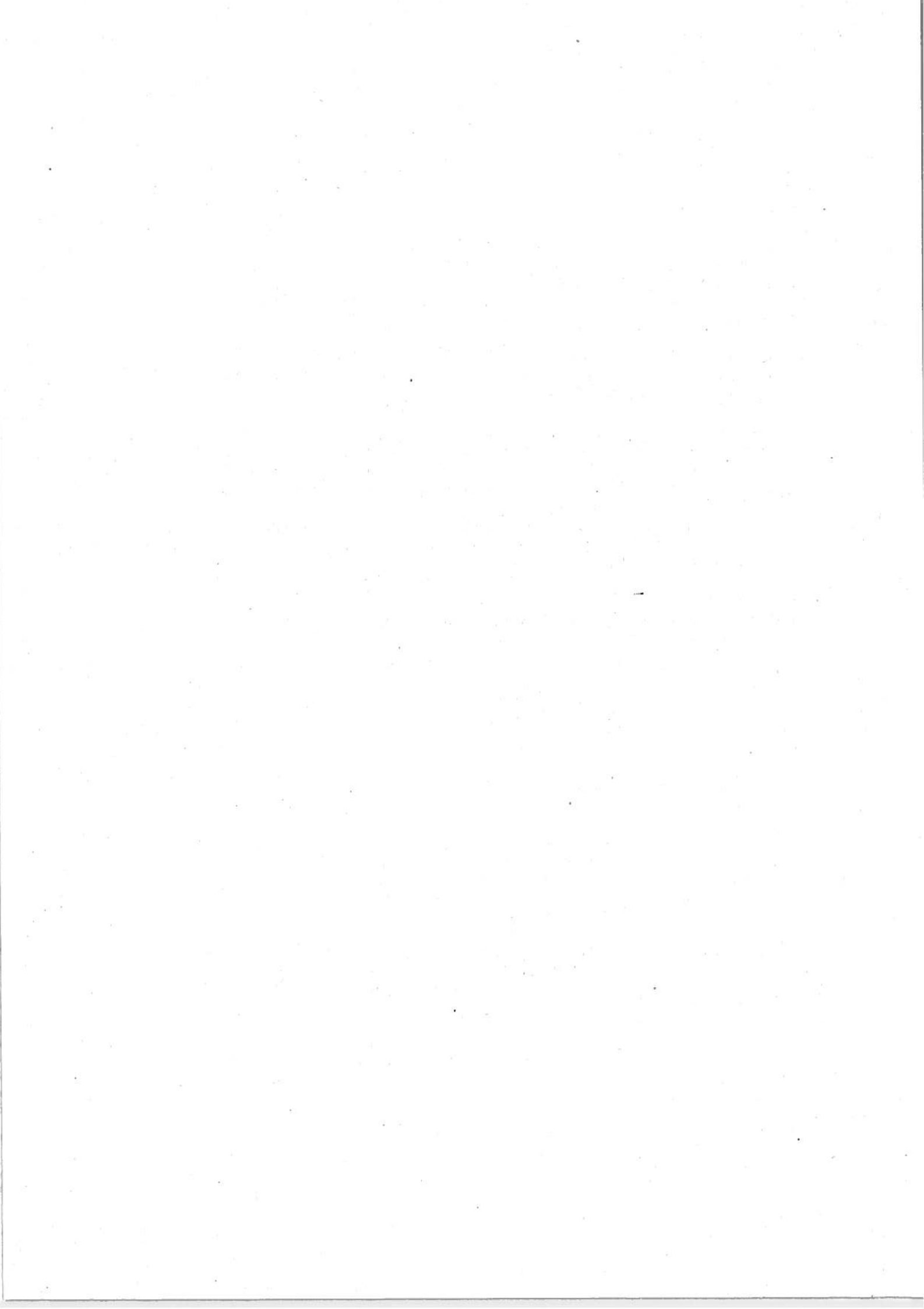
mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv. Algemeen Secretaris

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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en woonplaats: 6500 HB Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 november 2015 tot en met 1 oktober 2020, voor het project "Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery" met aanvraagnummer AVD103002015270, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Postdoc. Voor de uitvoering van het project is de IvD verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 oktober 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 2 oktober 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 3 november 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 2 oktober 2015, ontvangen op 2 oktober 2015;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 19 oktober 2015 en 3 november 2015.

Dierproeven

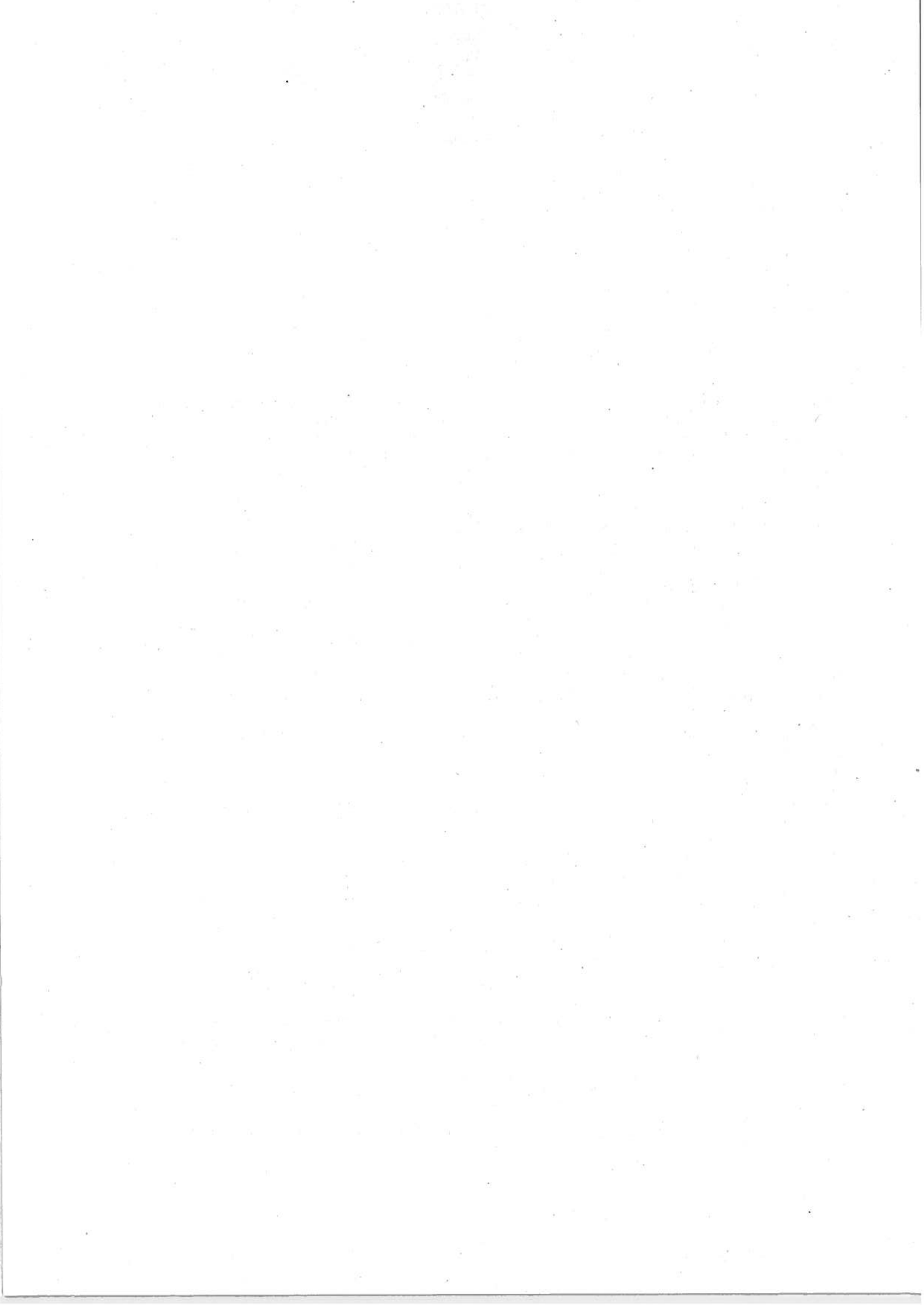
Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Determining the bio-distribution of cell-penetrating peptides in normal mice	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / beide geslachten; 6-52 weken oud; verschillende stammen	150	Licht/ Mild
Determining the effective/specific delivery of drugs using cell-penetrating peptides in normal mice	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / gelijk aan dierproef 1	200	Licht/ Mild
Application of drug delivery using cell-penetrating peptides in the treatment of mouse models for human kidney diseases	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / gelijk aan dierproef 1	750	85% Matig/ moderate 15% Ernstig/Severe

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk 1 oktober 2021 plaatsvinden.

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen met instemming van de IvD.

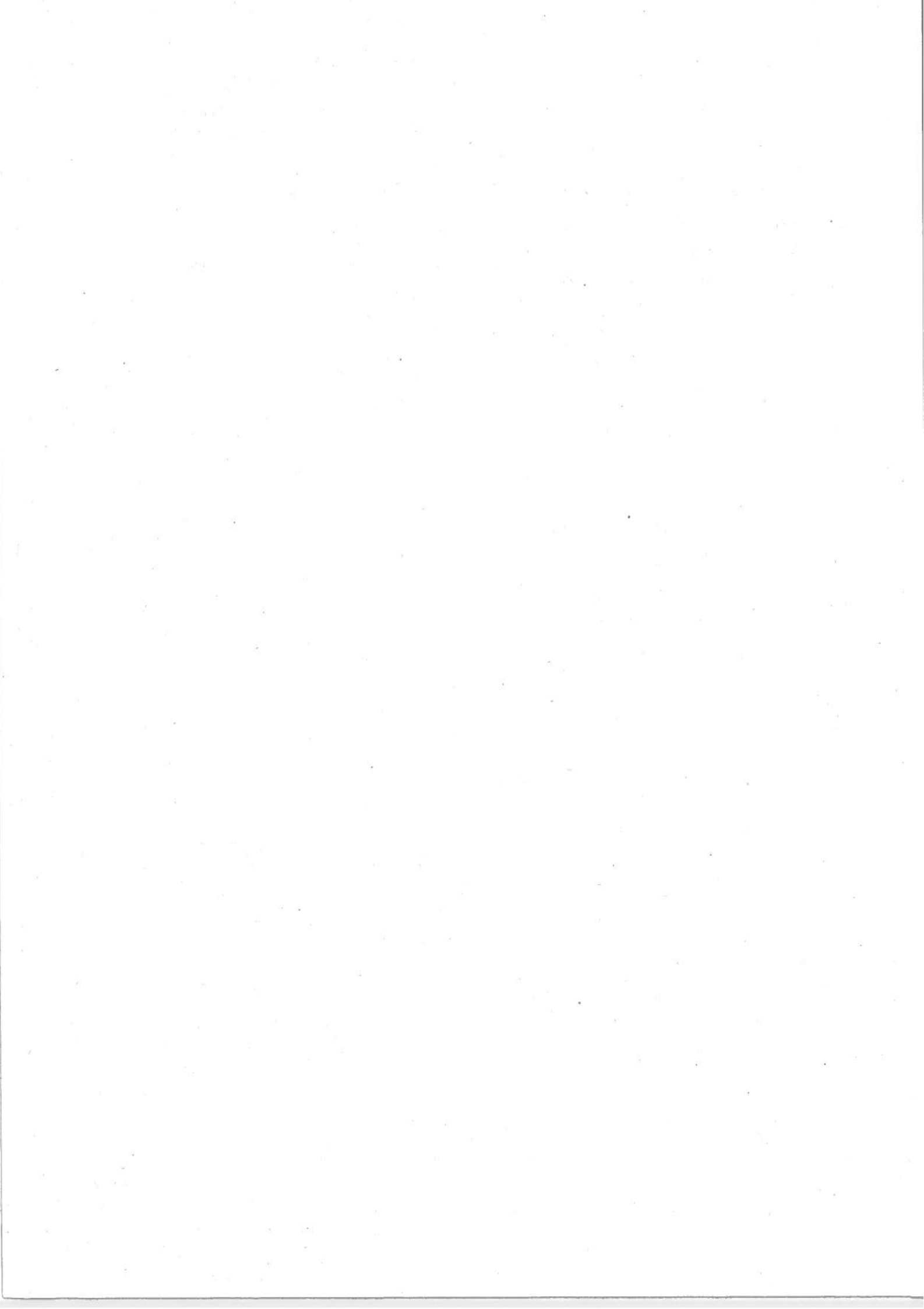
In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren



Datum
12 november 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015270

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.

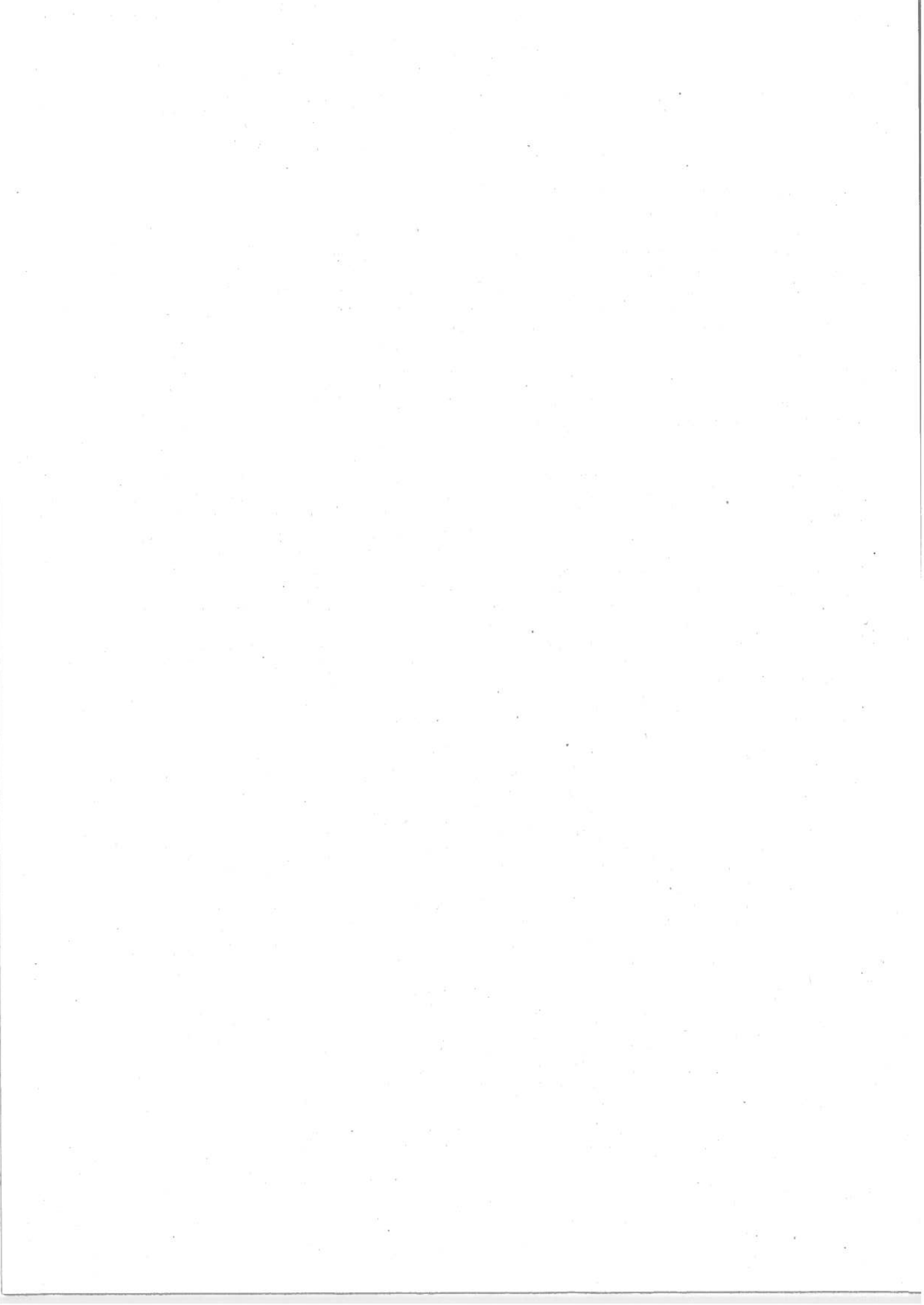
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

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
12 november 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015270

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.

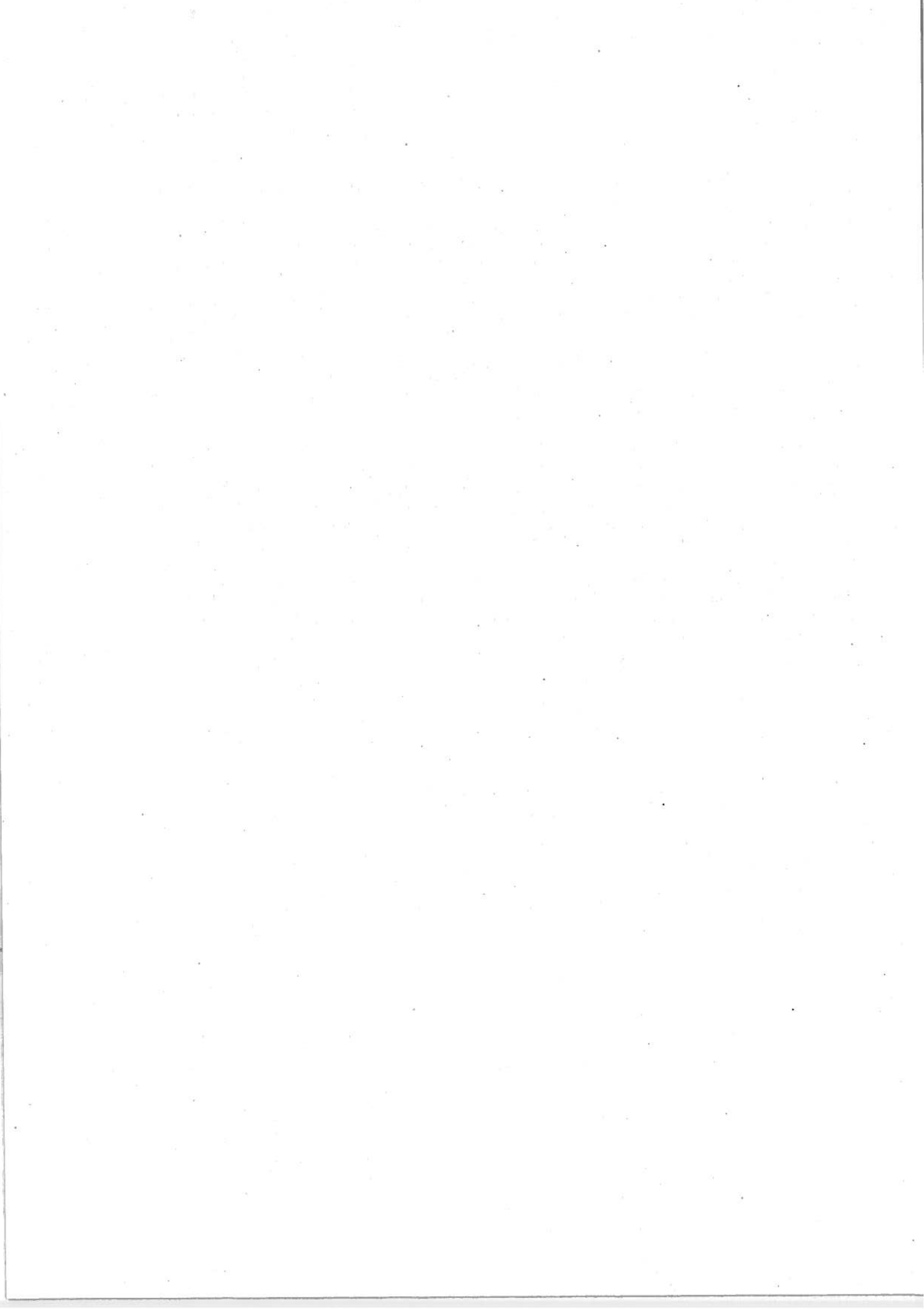
Uit artikel 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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.

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 een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 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.



DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0034
2. Titel van het project: Application of cell-penetrating peptides in organ-specific drug delivery.
3. Titel van de NTS: Toepassing van nanodeeltjes in het gericht afleveren van medicijnen in het zieke orgaan.
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
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 13-04-2015
 - anderszins behandeld: herbespreking in DEC-vergadering op 02-06-2015
 - termijnonderbreking(en) van 20-04-2015 tot 21-05-2015 en van 28-07-2015 tot 28-08-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 21-05-2015 en 28-08-2015
 - advies aan CCD: 02-10-2015
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: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen:
Niet-technische samenvatting:
 - Deze niet-technische samenvatting is te lang, mede door de vele herhalingen, en bevat een veelheid aan stijl- en spelfouten. De onderzoekers worden verzocht de lengte aan te passen conform de richtlijnen van de CCD en tevens op zinsbouw en spelling te letten.
 - Project Proposal:**
 - 1.3 en 3.1. In de titel wordt gesuggereerd dat de onderzochte peptides op eigen kracht de celwand penetreren, zonder actieve bijdrage hieraan van de betreffende cellen. Kunnen de

beschreven peptides werkelijk op eigen kracht de celwand penetreren, of is dit een endocytose-gemedieerd proces? De onderzoekers worden verzocht het proces van opname door de cel nader toe te lichten, en zonodig de terminologie aan te passen.

-3.1. Op basis van welke bevindingen denken de onderzoekers dat er mogelijk peptides bestaan die specifiek worden opgenomen door endotheelcellen van andere organen dan wel specifiek [REDACTED] penetreren van andere organen? Zij worden verzocht dit beter toe te lichten.

-3.4 strategie B. Op grond van welke criteria selecteren de onderzoekers peptides om te testen in dierexperimenten? Indien er een in vitro stap vooraf gaat aan deze dierproeven, verzoekt de commissie de onderzoekers deze stap te beschrijven en nauwkeurig aan te geven op grond van welke criteria peptides geselecteerd zullen worden voor het bepalen van de bio-distributie in muizen. De commissie vindt het belangrijk dat deze afweging zorgvuldig gebeurt.

-3.4 strategie B. De beoogde diermodellen voor een humane ziekte zijn nog niet bekend, waardoor de DEC geen goede ethische afweging kan maken over dit deel van de projectaanvraag. Zij verzoekt de onderzoekers dan ook deze stap uit strategie B te verwijderen. Indien de onderzoekers te zijner tijd zullen kiezen voor een diermodel voor een specifieke humane ziekte, kunnen zij via een wijziging op deze projectaanvraag of een nieuwe projectaanvraag toestemming vragen voor dergelijke dierexperimenten. Zij worden verzocht deel 3 toe te spitsen op het nierziekte-model. Mits de selectie van peptides voldoende wordt onderbouwd, kunnen deel 1 en 2 wel uitgevoerd worden met nieuw te ontwikkelen peptides.

Description of Animal Procedures:

-Dierproef 1 en 2. A, tweede vraag. In het huidige experiment wordt de muis driemaal onder anesthesie gebracht binnen 6 uur. Waarom gebruiken de onderzoekers geen langdurige anesthesie waardoor het een terminaal experiment wordt met minder ongerief voor de dieren? Zij worden verzocht dit aan te passen dan wel toe te lichten waarom zij herhaalde anesthesie willen toepassen.

-Dierproef 3. De onderzoekers worden verzocht dit uitsluitend voor het nierziekte-model te beschrijven.

- Datum antwoord: 18-05-2015

Niet-technische samenvatting:

- Wij zijn ons bewust van de adviserende richtlijnen van de CCD betreffende de lengte van de niet-technische samenvatting (namelijk ongeveer 500 woorden, met uitzondering van de vragen). In het gewijzigde projectvoorstel hebben we daarom de lengte van de tekst ingekort van ongeveer 1500 naar 660 woorden. Verder bieden wij onze excuses aan voor enkele spel- en taalfouten in de niet-technische samenvatting, welke zijn gecorrigeerd in de gewijzigde aanvraag.

Project Proposal:

- 1.3 en 3.1- Wij begrijpen dat de commissie de term "celpenetrerende peptiden" mogelijk verkeerd heeft geïnterpreteerd. Wij suggereren hiermee niet dat de peptiden op eigen kracht de celmembraan passeren, en dat de cel hier geen actieve bijdrage aan levert. Sinds ongeveer 20 jaar wordt deze term binnen de wetenschappelijke wereld gebruikt voor peptiden die de celmembraan makkelijk kunnen passeren en daarbij hun "vracht"

meenemen (waaronder RNA, DNA en eiwitten). Het mechanisme waarmee celpenetrerende peptiden de cel binnen dringen is de afgelopen tientallen jaren uitgebreid onderzocht. Onder andere de afdeling [REDACTED] heeft hierin een vooraanstaande rol gespeeld. Uit dit onderzoek is gebleken dat celpenetrerende peptiden zowel via directe translocatie als endocytose het celmembraan kunnen passeren. Dit is afhankelijk van het celpenetrerende peptide, maar ook van de concentratie van het peptide, het celtype en de getransporteerde vracht. Bovendien kan eenzelfde celpenetrerend peptide switchen tussen de verschillende mechanismen, afhankelijk van de omstandigheden. In beiden processen (directe translocatie en endocytose) spelen zowel het peptide als de cel een actieve rol. Dit gebeurt onder andere door binding aan specifieke suikers, vetzuren of eiwitten op het celmembraan (door het peptide), en het herrangschikken van moleculen in het celmembraan en/of rekrutering van signaal moleculen (door de cel). Meer informatie kunt u onder andere lezen in referentie 2 van onderdeel 3.1 van het projectvoorstel, of op Wikipedia (http://en.wikipedia.org/wiki/Cell-penetrating_peptide). Ter verduidelijking hebben wij in onderdeel 3.1 van het projectvoorstel de volgende zin toegevoegd: "The uptake mechanism of CPP into the cell can involve both direct translocation and endocytotic-mediated mechanisms, depending on the circumstances.". Verder hebben we een recent review artikel van [REDACTED]

-3.1. Wij zijn het eens met de commissie dat het moeilijk te voorspellen is, of er peptiden bestaan die specifiek worden opgenomen door endotheelcellen (of andere celtypen) in andere organen. Aan de andere kant staan celpenetrerende peptiden juist bekend om het feit dat ze heel goed allerlei verschillende celtypen binnen kunnen gaan. Op dit moment wordt er echter weinig onderzoek gedaan naar de celspecificiteit, en het daarbij behorende opname mechanisme, van de verschillende celpenetrerend peptiden. Wel is er een vrij recente publicatie (Sarko et al., ref. #5 in onderdeel 3.1 van de gewijzigde aanvraag) die laat zien dat er een duidelijk verschil is in de biodistributie van een tiental bekende celpenetrerende peptiden naar de nieren en lever, maar ook milt, longen, hart en darmen. Verder weten we uit eigen onderzoek dat suikers aan de buitenkant van de cel, en de compositie van het membraan, bepalen of een bepaald celpenetrerend peptide wordt opgenomen in het desbetreffende celtype (o.a. beschreven in ref. 3, 6 en 7 in onderdeel 3.1 van de gewijzigde aanvraag). Dat heeft ons er oorspronkelijk toe gebracht om de celspecificiteit *in vitro* en *in vivo* nader te onderzoeken. Door verschillende celpenetrerende peptiden op orgaanspecifieke cellijnen te testen, hebben we gevonden dat celpenetrerende peptiden afgeleid van [REDACTED] uitermate geschikt zijn om nierspecifieke cellen (en dan vooral cellen uit het [REDACTED] te targeten. Deze resultaten hebben we vervolgens kunnen bevestigen in *in vivo* experimenten in muizen. Op dit moment zijn we het precieze opname mechanisme van deze peptiden aan het onderzoeken, maar het lijkt erop dat naast het celpenetrerende activiteit er ook een binding aan een specifieke receptor plaatsvindt. We weten uit eigen resultaten dat het specifieke opname mechanisme van een celpenetrerende peptide afhangt van zowel de karakteristieken van het peptide, als het celtype. Bovendien kunnen eiwitdomeinen die een celpenetrerende activiteit bevatten, zoals enkele dichtopeenvolgende arginines, makkelijk gecombineerd worden met een bekend

aminozuursequentie die bindt aan een cel- of orgaanspecifieke suiker of receptor. Daarom denken wij dat het mogelijk moet zijn om celpenetrerende peptiden te ontwikkelen die specifiek zijn voor andere celtypes of organen, naast het [REDACTED]. Wij hebben onderdeel 3.1 (Background) nu uitgebreid met deze informatie.

-3.4 strategie B. Uiteraard zullen wij een zorgvuldige afweging maken over welke celpenetrerende peptiden we uiteindelijk zullen gebruiken in dierexperimenten. Onze afdeling heeft een ruime ervaring in het ontwikkelen van nieuwe celpenetrerende peptiden en het testen in verschillende *in vitro* assays. Hierbij worden peptiden toegevoegd aan cellijnen afkomstig uit verschillende organen, en worden de opname eigenschappen bepaald m.b.v. confocale microscopie en flowcytometrie. Criteria voor een celpenetrerend peptide geschikt voor *in vivo* gebruik, zullen zijn: (1) een selectieve opname in een beperkt aantal celtypes; (2) capaciteit om effectief nanopartikels en/of potentiële medicijnmoleculen af te leveren; (3) geen zichtbaar toxisch effect; (4) en stabiliteit in aanwezigheid van serum. Zoals al eerder vermeld, hebben we de selectieve targeting van cellen in het [REDACTED] door [REDACTED] celpenetrerende peptiden, ook gevonden door verschillende celpenetrerende peptiden te testen op allerlei cellijnen. Het is belangrijk te vermelden dat de *in vitro* resultaten voorspellende waarden hadden voor de *in vivo* distributie van deze peptiden in muizen. We hebben de *in vitro* assays en bijbehorende criteria toegelicht in onderdeel 3.4 van de gewijzigde aanvraag.

-3.4 strategie B. Wij begrijpen dat het moeilijk is voor de DEC om een goede afweging te maken, wanneer de toekomstige diermodellen nog niet bekend zijn. Daarom hebben wij deze stap uit strategie B verwijderd, en onderdeel 3 toegespitst op muizenmodellen voor nierziekten. De zorgvuldige selectie van peptiden is verder onderbouwd in de gewijzigde aanvraag (zie ook antwoord bij de vorige opmerkingen).

Description of Animal Procedures:

-Dierproef 1 en 2. A, tweede vraag. Wij het protocol aangepast in de gewijzigde aanvraag, en zullen een langdurige anesthesie toepassen.

-Dierproef 3. Wij hebben dit onderdeel in de gewijzigde aanvraag uitsluitend gericht op de nierziektmodellen.

- Datum: 28-07-2015

Strekking van de vragen:

In bijlage 3 ontbreekt een concrete beschrijving van de diermodellen voor nierfalen die de onderzoekers willen gebruiken om hun nieuwe geneesmiddelfgifte systeem in te testen. Zij worden verzocht dit toe te voegen aan de aanvraag.

- Datum antwoord: 28-08-2015

Strekking van de antwoorden:

Naar aanleiding van uw commentaar hebben wij het onderdaal DAP-3 van onze aanvraag op een aantal punten gewijzigd. Hierbij is een meer gedetailleerde omschrijving van de diermodellen toegevoegd, inclusief aanvullende informatie over de benodigde handelingen, uitleesparameters en keuzecriteria. Onze excuses voor het ontbreken hiervan. Wij zijn het volledig met de DEC eens, dat deze informatie essentieel is om de aanvraag goed te kunnen beoordelen.

Verder hebben wij e.e.a. duidelijker opgeschreven, aangezien wij begrepen dat dit niet duidelijk was overgekomen bij de DEC. In de aanvraag hebben wij het over diermodellen

voor een zestal ziekten (bij mensen), waarvoor al ervaring bij de afdeling [REDACTED] bestaat. Wij hebben nu ook de desbetreffende diermodellen voor iedere humane ziekte toegevoegd. Verder noemen wij later dat we per behandeling drie modellen uitkiezen die het best geschikt zijn voor die behandeling. Waarmee we niet bedoelen dat we maar drie modellen in het totaal zullen gebruiken. Ook dit hebben we nu wat duidelijker proberen op te schrijven.

- 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 develop a novel drug delivery strategy based on cell-penetrating peptides, which targets specific organs or cell-types and locally delivers drugs for therapeutical applications'. De te behalen onderzoeksresultaten zullen resulteren in de identificatie van celpenetrerende peptides die specifiek ophopen in bepaalde organen, en in de evaluatie van therapie op basis van celpenetrerende peptides die zorgen voor nierspecifieke medicijnafgifte in een nierziektemodel. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van nieuwe methoden om medicijnen gericht af te leveren in een doelorgaan waardoor patiënten mogelijk minder last van bijwerkingen van deze medicijnen zullen hebben.
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 met de ontwikkeling van celpenetrerende peptides en biodistributie experimenten. Voor de proeven met diermodellen voor nierziekten wordt nauw samengewerkt met onderzoeksgroepen die hier veel ervaring mee hebben. De proeven volgen logisch op elkaar. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de ontwikkeling van nieuwe celpenetrerende peptides die specifiek ophopen in bepaalde organen van muizen, en het effect van therapie met celpenetrerende peptides die zorgen voor nierspecifieke medicijnafgifte in een nierziektemodel in muizen.
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 de meeste dieren realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de muizen wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de injectie van celpenetrerende peptides en de inductie van een nierziekte met de daarop volgende behandeling. De DEC schat het ongerief als gevolg van de injecties met medicijnen of celpenetrerende peptiden (al dan niet gekoppeld aan medicijnen) en het kortdurend verblijf in een metabole kooi in als licht. Het ongerief als gevolg van het imageren onder anesthesie is terminaal. Het ongerief voor de dieren die een nierziekte ontwikkelen (dierproef 3) als gevolg van genetische aanleg, een injectie met LPS, meerdere injecties met streptozotocine of een injectie met anti- antistoffen schat de commissie in als matig voor de meeste dieren (ongeveer 85% van de behandelde dieren). Een minderheid van de behandelde dieren (ongeveer 15%) zal ernstige ziekteverschijnselen ontwikkelen en een humaan eindpunt bereiken. De commissie schat het ongerief voor deze dieren in als ernstig, waarmee zij dus afwijkt van de beschreven inschatting van het ongerief in de aanvraag. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is volgens de DEC licht voor 30% van de muizen, matig voor 60% van de muizen en ernstig voor 10% van de muizen.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Een deel van het project wordt in vitro uitgevoerd, voor het andere deel 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. De biodistributie en afbraak van de celpenetrerende peptide-complexen kan alleen goed in vivo worden onderzocht, waarvoor dieren nodig zijn die qua fysiologie voldoende op mensen lijken. De onderzoekers kiezen voor muizen omdat er voldoende orgaanspecifieke ziektemodellen in dit dier zijn.
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. De verschillende dierexperimenten volgen logisch op elkaar, en resultaten uit eerdere experimenten worden gebruikt bij de opzet van daarop volgende experimenten. Door het inbouwen van go/no go momenten op basis van heldere criteria wordt voorkomen dat onnodige dierexperimenten worden uitgevoerd. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1100 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 biodistributie-experimenten vinden plaats onder terminale anesthesie, zodat de dieren geen ongerief ervaren door het ontwaken uit de anesthesie. De dieren waarbij een nierziekte wordt geïnduceerd worden regelmatig gecontroleerd op ziekteverschijnselen, en druppels van hun urine worden regelmatig onderzocht op ernstige proteïnurie. Op die manier kunnen zieke dieren in een vroeg stadium van nierziekte op humane wijze gedood worden om onnodig lijden van de dieren te voorkomen. 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 inzichten verkregen in het therapeutische effect van celpenetrerende peptide-complexen die zorgen voor nier specifieke medicijnafgifte in nierziektedmodellen bij muizen, en worden nieuwe celpenetrerende peptides geïdentificeerd die specifiek ophopen in bepaalde organen. Het is aannemelijk dat dit inzicht kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe methoden om medicijnen gericht in een doelorgaan af te leveren. Veel medicinale therapieën veroorzaken bijwerkingen doordat een systemisch toegediend medicijn niet alleen een effect heeft op het doelorgaan, maar ook op andere (niet aangedane) organen. Wanneer dergelijke medicijnen specifiek in het doelorgaan kunnen worden afgeleverd, zal de kans op bijwerkingen vanwege een effect in andere organen aanzienlijk afnemen. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 60 % van de muizen matig ongerief en 10 % van de muizen ernstig ongerief zal ondervinden als gevolg van de nierziekte die eerst wordt geïnduceerd en vervolgens behandeld. Voor 30% van de muizen blijft het ongerief beperkt tot licht. 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.

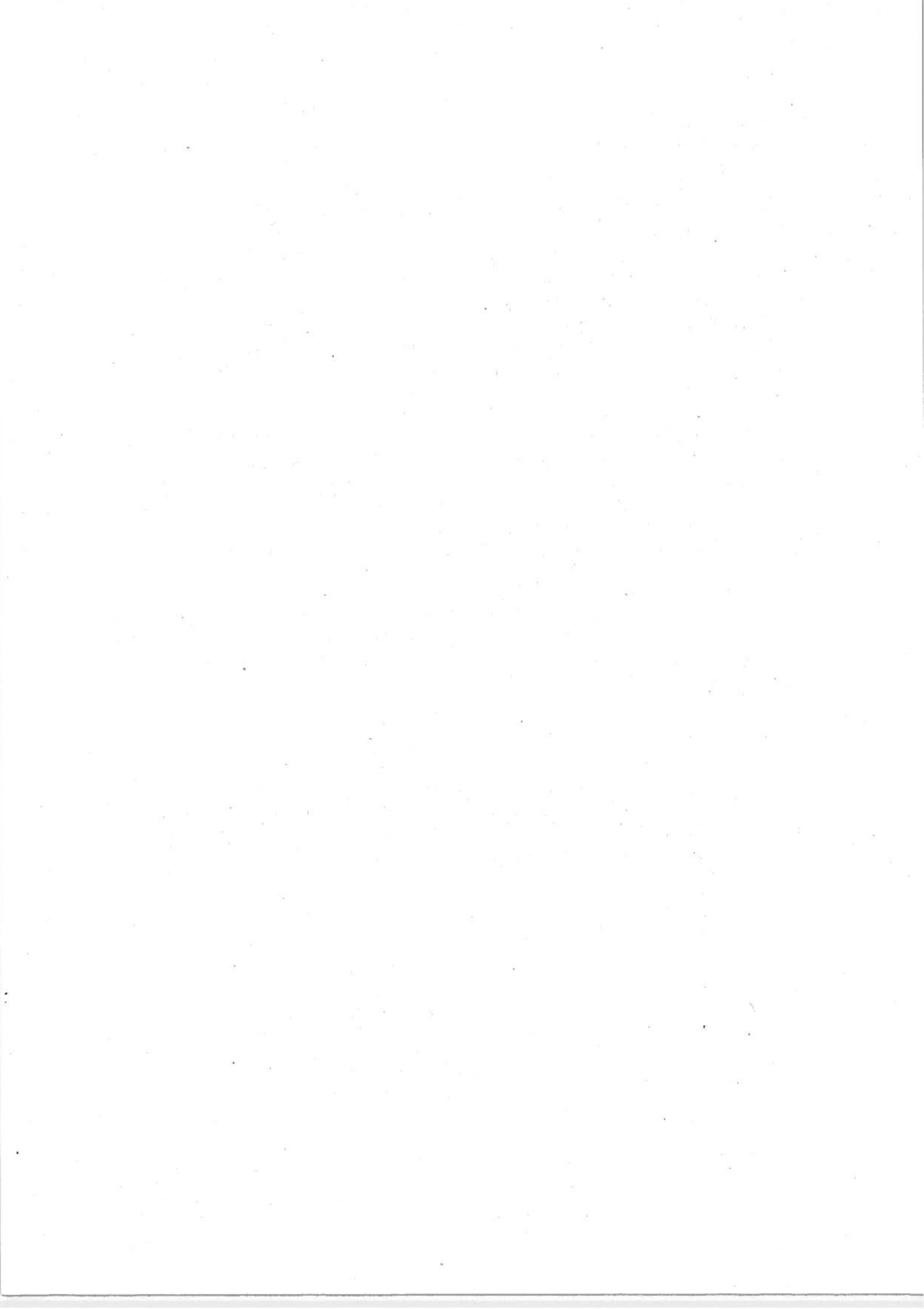
De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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



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
	NTS2015275								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x			x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven				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	
10	Mail beschikking 3-12-2015				x		x	x	
11	Mail terugkoppeling 7-12-2015				x		x	x	



14 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 10300 1275
 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, [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] Dhr. Mw.
 Functie: arts onderzoeker in opleiding
 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] Dhr. 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 08 . 11 . 2015

Einddatum 08 . 11 . 2017

- 3.2 Wat is de titel van het project?

In vivo degradation and tissue response of poly(TMC)-E-caprolacton based networks

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Een studie naar de onderhuidse weefselreactie op, en de afbraak van, poly(TMC)-E-capr

- 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.
- 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 12 - 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.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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | A study to identify the best suited material for meniscus tissue engineering |

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 or 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 menisci fulfill key biomechanical functions in the knee joint.[ref 1] Unfortunately, traumatic meniscal injuries are quite common, accompanied by acute clinical symptoms such as knee pain, locking, and joint effusions. First documented treatments embraced swift and total meniscectomy to ameliorate acute symptoms. However, an increased understanding of the osteoarthritic changes that occur after total meniscectomy made clear that it is beneficial to save as much meniscal tissue as possible. This conception led to an increased clinical and scientific interest to develop new treatment strategies for meniscal injuries, aimed to prevent osteoarthritic changes otherwise encountered with arthroscopic (partial) meniscectomy. For example, meniscus repair by suturing is nowadays being performed preferentially above arthroscopic partial meniscectomy. However, meniscus repair by suturing is only suited for a limited part of all traumatic meniscal injuries, and the majority of the meniscal injuries is still treated by removing the meniscus, either completely or partially.

A functional meniscus implant that slowly resorbs and simultaneous allows the formation of new tissue would be of enormous benefit for patients faced with an injured meniscus. Synthetic biodegradable polymers are the materials of choice to create such implants. Such implant will act as a temporary replacement of the lost meniscus. After tissue ingrowth and resorption of the polymer, complete restoration of meniscus functionality is achieved and osteoarthritic degeneration will be prevented. We identified a number of properties that are of critical importance for the success of a functional meniscus implant [ref 1]: The anatomical shape of the implant and its mechanical properties should resemble those of the native meniscus as closely as possible. The structure of the internal pore network of the implant should enable the direct differentiation of ingrowing tissue into the typical meniscus tissue. For this, the pores should be highly anisotropic and oriented in a similar way as the orientation of the collagen bundles in the native meniscus. Furthermore, the implant surface should have excellent tribological properties to minimize friction in the joint.

So far it has not been possible to produce such an implant with conventional technologies.[ref 1]

We want to develop a functional tissue regenerating implant for the replacement of a meniscus using high resolution stereolithography (SLA). This advanced processing technology allows the generating of anatomically shaped implants from graphical computer data based on CT or MRI images. The technique also allows the creation of predesigned anisotropic internal pore architecture, optimized for the direct differentiation of ingrowing

tissue into meniscus tissue. For this, **poly- 1,3-trimethylene carbonate (i.e. PTMC)** based resins that cure into biodegradable flexible networks upon illumination with light will have to be developed.

Linear PTMC is a flexible, biocompatible polymer that has been shown to degrade by surface erosion in vivo without the formation of acidic compounds.[ref 2, 3] Crosslinking of PTMC macromers (methacrylate functionalized oligomers) results in form-stable and creep resistant elastomeric networks with a high stiffness.[ref 3] Network properties can be varied by varying the molecular weight of the initial PTMC macromer, allowing the creation of structures with any desired stiffness and strength.[ref 3] Rigid and brittle materials can be obtained by crosslinking macromers with low molecular weight, while crosslinking of macromers with relatively high molecular weight will result in flexible, rubber-like elastomers. [ref 4]

Photo crosslinked networks of PTMC demonstrated good cell biocompatibility good tissue tolerance after subcutaneous implantation in rats (own research, manuscript in preparation). The tissue response was characterized by a mild foreign body reaction resulting in encapsulation of the implants (own research, manuscript in preparation). However, the rate of degradation was observed to be too slow for these PTMC networks to be used as a biomaterial to prepare a meniscus scaffold. (own research, manuscript in preparation. Preparing photo crosslinked networks of copolymers of PTMC and either caprolacton or d,l-lactide (DLLA) provide means to tune the degradation rate of the networks. In their linear form (e.g. not crosslinked and not processed via stereolithography) both PTMC copolymers are biodegradable and biocompatible materials.[ref 3]

Preliminary in vitro studies (unpublished data, own research) demonstrated that photo crosslinked networks of copolymers of PTMC and DLLA degraded too fast and via bulk degradation (unpublished data, own research), and are therefore believed unsuitable for meniscus tissue engineering. On the other hand, networks of copolymers of PTMC and caprolacton demonstrated a more suitable degradation profile in vitro, making them attractive candidates for meniscus tissue engineering. However, the suitability of these materials will have to be further evaluated in vivo in a clinically relevant animal model.

1. Rongen JJ, van Tienen TG, van Bochove B, Grijpma DW, Buma P. Biomaterials in search of a meniscus substitute. *Biomaterials*. 2014;35(11):3527-3540.

[this reference provides a comprehensive summary of all current biomaterials that have been used in order to develop a meniscus substitute. In this review we provide an overview, and discuss, these different materials and extract recommendations regarding material properties for future developmental research]

2. Bat E, Harmsen MC, Plantinga JA, van Luyn MJ, Feijen J, Grijpma DW. Flexible scaffolds based on poly(trimethylene carbonate) networks for cardiac tissue engineering. *J Control Release*. 2010;148(1):e74-76.

3. Pego AP, Van Luyn MJ, Brouwer LA, et al. In vivo behavior of poly(1,3-trimethylene carbonate) and copolymers of 1,3-trimethylene carbonate with D,L-lactide or epsilon-caprolactone: Degradation and tissue response. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(3):1044-1054.

4. Schuller-Ravoo S, Feijen J, Grijpma DW. Flexible, elastic and tear-resistant networks prepared by photo-crosslinking poly(trimethylene carbonate) macromers. *Acta Biomaterialia*. 2012;8(10):3576-3585.

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 objective of this study is to determine the in vivo degradation behavior (rate and **underlying mode of degradation**) of poly(TMC) / ϵ -caprolactone based networks.

As a secondary objective, assessed within the same experimental set up, we want to study the in vivo tissue response of these networks.

This experiment is part of a larger project assigned by [REDACTED] and all current research is regularly assessed [REDACTED].

This project will be carried out at the [REDACTED]

[REDACTED] Both laboratories are very well equipped to carry out the proposed research.

Specifically [REDACTED] the essential testing equipment, and technical expertise is available. The laboratory is well equipped for tissue processing for histology. The required analytical and technical procedures are carried out according to routine operating procedures. Immunohistochemical procedures are available. The [REDACTED] is up-to-date, and is ISO 9001 : 2008 certified.

[REDACTED] dedicated laboratory facilities for the synthesis of biodegradable polymers and their processing into medical devices are available. Characterization methods of oligomers and polymeric materials and their surfaces are operational: DSC, GPC, NMR, end-group analysis, viscometry, FTIR, UV-VIS, AFM, SEM, XPS, surface contact angle measurements, tensile testing, DMA, etc. Conventional and advanced polymer processing and structure characterization methods are present as well: compression molding, injection molding, extrusion, 3D-plotting, SLA, micro-CT.

3.3 Relevance

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

The menisci fulfill key biomechanical functions in the knee joint, distributing loads over two incongruent moving articular surfaces. A meniscus scaffold will act as a temporary replacement of the lost meniscus. After tissue ingrowth and resorption of the polymer, complete restoration of meniscus functionality is achieved. The **degradation rate** of a meniscus scaffold should take long enough time for adequate tissue ingrowth and organization in such way that itself can provide mechanical support. During this tissue ingrowth, the framework of the scaffold itself should provide mechanical support. Too fast degradation, losing the framework before adequate tissue ingrowth and organization, will have deleterious effect of the pursued function of the scaffold-tissue construct.

With respect to the **mode of degradation**, a surface degradation profile (in which size and mass of the scaffold decrease linear in time, whereas molecular weight and mechanical properties of the polymer itself remain unchanged) is required. A bulk degradation profile (in which polymer chain

scission occur throughout the specimen, losing its mechanical properties before its mass, but retaining its external dimensions until disintegration at a critical time point) is not desired.

Next to the evaluation of the degradation rate and **mode of degradation**, we will evaluate the tissue response of the materials after implantation. This is important because material - tissue compatibility (biological safety) is a requisite for future application of a meniscus scaffold in humans.

3.4 Research Strategy

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

Implants of three different P(TMC) networks will be prepared, with varying percentages of ϵ -Caprolactone. These implants will be implanted subcutaneously on the back of rats, under general anesthesia. Multiple implants will be implanted per rat, which will be used either for evaluation of implant degradation or the evaluation of tissue response.

In this experiment we will address degradation of the networks subcutaneously instead of addressing it in its intended location of future use (intra-articular in the knee joint). We assume that similar cell mediated processes, triggered by an inflammatory response, responsible for the expected surface degradation will be present in both locations (either subcutaneously as well as in a well vascularized region of the knee joint). So, we assume that the information obtained from the subcutaneous degradation study can be, in part, translated to an intra-articular environment.

Degradation will have to be assessed at various time points, allowing the characterization of the **mode of degradation**. Moreover, local tissue responses will have to be evaluated relative to the degradation process of the implant at various time points. Therefore, rats will be sacrificed at **five** time points.

We will use both early time points (where there is no or minimal degradation) as well as at late time points (when degradation is taking place and/or when a steady state has been reached resulting in tissue restoration)

The primary outcome measure will be mass loss after subcutaneous implantation in the context of evaluation of degradation. Secondary outcome measures are: loss in thickness of implants, change in mechanical properties of implants (e.g. stiffness, elongation at break, stress at break, yield point), surface visualization by SEM of implants, and tissue response.

These outcomes provide detailed information on rate and **mode** of degradation of the different networks, as well as information on tissue response over time.

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 project proposal encompasses only one component (e.g. one coherent animal experiment). The strategy of this component was addressed in 3.4.1

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 project proposal encompasses only one component (e.g. one coherent animal experiment). The strategy of this component was addressed in 3.4.1

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	1. In vivo degradation and tissue response of poly(TMC) based networks in rats

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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>1. In vivo degradation and tissue response of poly(TMC) based networks in rats</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	1. In vivo degradation and tissue response of poly(TMC) based networks in rats
Serial number	Type of animal procedure					
1	1. In vivo degradation and tissue response of poly(TMC) based networks 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.

The main objective of this study is to determine the in vivo degradation behavior of poly(TMC) / ϵ -Caprolactone based networks. As a secondary objective, assessed within the same experiment, we want to study the in vivo tissue response of these implants.

Films of three different P(TMC) networks will be prepared, with varying percentages of ϵ -Caprolactone. These implants (**dimensions $\pm 20 \times 10 \times 0.5$ (lxbxh)**) will be implanted subcutaneously in the back of rats, under general anesthesia. Per rat, four subcutaneous pockets will be made. Three films per rat (one of each network) will serve to evaluate in vivo degradation behavior, whereas a fourth implant will be removed complete with its surrounding tissue to evaluate tissue response.

Rats will be sacrificed and implants evaluated after early follow up time points (0-12 weeks) where there is no or minimal degradation, and late follow up time points (24-54 weeks) when degradation is taking place and when a steady state has been reached resulting in tissue restoration.

The primary outcome measure will be mass loss after subcutaneous implantation.

Secondary outcome measures are: loss in thickness, change in mechanical properties (e.g. stiffness, elongation at break, stress at break, yield point), surface visualization by SEM, and tissue response (semi quantitative grading scale).

These outcomes provide detailed information on rate and **mode** of degradation of the different networks, and its tissue response over time.

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

The implants will be implanted, under sterile conditions, subcutaneous on the back of the rats, under general anesthesia. After implantation the wounds will be surgically closed, upon which the rats are housed in pairs in standard cages.

Rats will be sacrificed and implants evaluated after early follow up time points (0-12 weeks) where no or minimal degradation is expected (based on pilot studies), and late follow up time points (24-54 weeks) when degradation is expected and when a steady state will have been reached resulting in tissue restoration. **We will apply 5 time points, divided over early and late time points.**

Using different time points of follow up allows the characterization of the **mode** underlying the degradation. Moreover, different time points allow evaluation of local tissue responses relative to the degradation process of the implant

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

Previous experiments demonstrated that it is possible to implant a maximum of 4 implants in four separate non communicating subcutaneous pockets on the back of rats. By implanting several implants per rat we are able to reduce the number of animals needed for the experiment. Moreover, previous experiments showed that we **will need 8 animals per time point (with 5 time points we will need 40 animals in total)** to be able to demonstrate a clinical meaningful loss in mass with statistical significance (a more detailed sample size calculation will be performed prior to the start of the experiment).

B. The animals

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

Small animals are preferred for this experiment. Of the small animals, rats have the advantage that several implants can be implanted within the same animal. Moreover, we have experience with using rats as the animal model, and it allows comparison of the results with our previous experiments. We will use both male and female rats in our experiment.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rats	registered breeding facility	40	280-320 gr

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: Because it is not completely understood what processes are responsible for the degradation of the networks, it is still not possible to replicate this process in a bioreactor. Therefore this experiment cannot be performed without in vivo conditions.

Reduction: Reduction will be achieved by performing a statistical sample size calculation prior to the experiment and the placement of multiple implants per animal

Refinement: It is our experience that the rats only experience **moderate** discomfort perioperatively, this will be treated by providing adequate analgesia. Alternatively, reducing the number of implants per rat will increase the total number of rats needed in the experiment. But, since the discomfort is only **moderate**, reducing the number of implants per rat is not necessary.

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

Adequate pain relief pre and post operatively. Housing in pairs.

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

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.

Standard operating procedures for pain management according to the local animal laboratory (**anesthesia by using isofluraan, and perioperative pain management by using carprofen**)

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

No other adverse effects on welfare are expected. Although an infection of the surgical wound is possible, it is our experience that this is unlikely to occur.

Explain why these effects may emerge.

bacterial infection caused by bacterial contamination of the surgical wound perioperatively

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

Surgeries will be performed applying appropriate aseptic techniques

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

No experiment specific humane endpoints are expected (see section J3). Therefore, in line with the recommendations of the local animal welfare body, general humane endpoints are adopted [REDACTED]

If anything happens during the experiment that leads to more, or other, discomfort than anticipated, whether or not associated with the experiment, the situation should always be checked for whether there is a humane endpoint.

Criteria for the use of the humane endpoint:

- 1) The animal is experiencing more than minor added discomfort due to circumstances unrelated to the experiment;**
- 2) The animal is experiencing more distress than justifiable for the purpose of the experiment and then weighed by the DEC;**
- 3) (Reliable and useful) results cannot be achieved by reasons unrelated to the experiment;**

4) The purpose of the experiment has been reached;

The responsible investigator should contact the animal welfare body if criteria 1, 2, 3 and / or 4 are applicable and the animal is not taken out of experiment.

If criteria 1, 2 and / or 3 are applicable, and the responsible investigator is unreachable, than the decision to take an animal out of the experiment is made by an animal caretaker/ biotechnical assistant/ related investigator, preferably after consultation.

Indicate the likely incidence.

The risk for developing an infection is limited, therefore the expected incidence of humane endpoints is smaller than 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).

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.

Of the four implants that will be implanted on the back of every rat, one of these implants will be used to evaluate the tissue response to the implants. For this purpose, we need to explant this implant completely with its surrounding skin and tissue. This creates a irreparable transdermal defect which is not compatibe with life.

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 2015-0087
2. Titel van het project: A study to identify the best suited material for meniscus tissue engineering
3. Titel van de NTS: Een studie naar het juiste materiaal voor meniscusimplantaten
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: 21-07-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 04-08-2015 en
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 13-08-2015 tot 02-09-2015 en van 15-09-2015 tot 16-09-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 02-09-2015 en 16-09-2015
 - advies aan CCD:09-10-2015
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: 13-08-2015
 - Strekking van de vragen:
Niet-technische samenvatting:
4.2 Het woord 'niet' staat ten onrechte in deze zin.
3.5 De verwachte ernst is voor 100% van de dieren matig i.p.v. licht.

Project Proposal:

-3.1 De aard van het materiaal is onvoldoende beschreven in de tekst. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen, inclusief verwijzingen naar literatuur hierover.

-3.1 en 3.2 De laatste alinea van onderdeel 3.1 gaat over de haalbaarheid van het project, en dient verplaatst te worden naar onderdeel 3.2.

3.3 De commissie is van mening dat niet het mechanisme maar de wijze (mode) van degradatie wordt onderzocht. De onderzoekers worden verzocht dit in de hele aanvraag aan te passen.

-3.3 Is subcutane plaatsing een goede voorspeller voor degradatie in het kniegewricht? De dikte van het implantaat zal hier ook een rol in spelen. De onderzoekers worden verzocht beter te onderbouwen waarom ectopische plaatsing relevante informatie oplevert.

Description of Animal Procedures:

-A De afmetingen van het implantaat ontbreken.

-B Het is onduidelijk waarom er 40 dieren nodig zijn voor dit experiment. Kunnen de onderzoekers aangeven en onderbouwen welke tijdstippen zij willen onderzoeken, en vermelden hoeveel dieren er per tijdstip nodig zijn?

-H. De onderzoekers dienen hier de middelen te noemen die gebruikt worden voor anesthesie en pijnbestrijding (vermelding van concentraties e.d. is niet nodig). Vervolgens mag inderdaad naar het gebruik van standaard protocollen verwezen worden.

-J. De incidentie van humane eindpunten is niet ingevuld. Het risico op infecties is zeer klein, hetgeen zal leiden tot een incidentie van humane eindpunten kleiner dan 1%.

-K. Het ongerief van een dier dat onder narcose geopereerd wordt en daarna weer ontwaakt is matig i.p.v. licht.

- Datum antwoord: 02-09-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

4.2 Reactie: Het woord 'niet' staat inderdaad te onrechte in deze zin.

Actie: "...om zo te voorkomen dat ~~niet~~ meer dieren gebruikt worden dan noodzakelijk."

3.5 Reactie: Indien het ongerief van een dier dat onder narcose geopereerd wordt en daarna weer ontwaakt matig i.p.v. licht is (ongeacht de duur en de aard van de ingreep) nemen we deze aanbeveling graag over. (zie ook: Animal procedures, sectie K)

Actie: Indeling naar de verwachte ernst: 100% matig

Project Proposal:

-3.1 Reactie: Achtergrond informatie betreffende het materiaal ontbreekt inderdaad. Hierbij moet worden vermeld dat de materialen in het huidige experiment nieuw ontwikkelde materialen zijn met een chemische samenstelling die niet eerder, of slechts in beperkte mate, beschreven zijn. Tegemoetkomend aan het verzoek van de commissie beschrijven we de aard van het materiaal beter. Naast verwijzingen naar de literatuur zijn we genoodzaakt ook te verwijzen naar nog niet gepubliceerd (eigen) onderzoek.

Actie: tekst toegevoegd:

Linear poly- 1,3-trimethylene carbonate (i.e. PTMC) is a flexible, biocompatible polymer that has been shown to degrade by surface erosion in vivo without the formation of acidic compounds.[ref 2, 3] Crosslinking of PTMC macromers (methacrylate functionalized oligomers) results in form-stable and creep resistant elastomeric networks with a high

stiffness.[ref 3] Network properties can be varied by varying the molecular weight of the initial PTMC macromer, allowing the creation of structures with any desired stiffness and strength.[ref 3] Rigid and brittle materials can be obtained by crosslinking macromers with low molecular weight, while crosslinking of macromers with relatively high molecular weight will result in flexible, rubber-like elastomers. [ref 4]

Photo crosslinked networks of PTMC demonstrated good cell biocompatibility and good tissue tolerance after subcutaneous implantation in rats (own research, manuscript in preparation). The tissue response was characterized by a mild foreign body reaction resulting in encapsulation of the implants (own research, manuscript in preparation). However, the rate of degradation was observed to be too slow for these PTMC networks to be used as a biomaterial to prepare a meniscus scaffold. (own research, manuscript in preparation). Preparing photo crosslinked networks of copolymers of PTMC and either caprolactone or D,L-lactide (DLLA) provide means to tune the degradation rate of the networks. In their linear form (e.g. not crosslinked and not processed via stereolithography) both PTMC copolymers are biodegradable and biocompatible materials.[ref 3]

Preliminary in vitro studies (unpublished data, own research) demonstrated that photo crosslinked networks of copolymers of PTMC and DLLA degraded too fast and via bulk degradation (unpublished data, own research), and are therefore believed unsuitable for meniscus tissue engineering. On the other hand, networks of copolymers of PTMC and caprolactone demonstrated a more suitable degradation profile in vitro, making them attractive candidates for meniscus tissue engineering. However, the suitability of these materials will have to be further evaluated in vivo in a clinically relevant animal model.

[Ref 2.] Bat E, Harmsen MC, Plantinga JA, van Luyn MJ, Feijen J, Grijpma DW. Flexible scaffolds based on poly(trimethylene carbonate) networks for cardiac tissue engineering. *J Control Release*. 2010;148(1):e74-76.

[Ref 3.] Pego AP, Van Luyn MJ, Brouwer LA, et al. In vivo behavior of poly(1,3-trimethylene carbonate) and copolymers of 1,3-trimethylene carbonate with D,L-lactide or epsilon-caprolactone: Degradation and tissue response. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(3):1044-1054.

[Ref 4.] Schuller-Ravoo S, Feijen J, Grijpma DW. Flexible, elastic and tear-resistant networks prepared by photo-crosslinking poly(trimethylene carbonate) macromers. *Acta Biomaterialia*. 2012;8(10):3576-3585.

-3.1 en 3.2 Reactie: Deze informatie over de haalbaarheid van het project behoort inderdaad onder onderdeel 3.2

Actie: De laatste alinea van onderdeel 3.1 werd verplaatst naar onderdeel 3.2

3.3 Reactie: Strikt gesproken wordt er inderdaad gekeken naar de manier/wijze/mode e.d. waarop de netwerken degraderen en niet naar het mechanisme dat daar aan ten grondslag ligt.

Actie: In de gehele aanvraag is aangepast dat het gaat om de wijze van degradatie i.p.v. het mechanisme van degradatie.

3.2 purpose: "... degradation behavior (rate and underlying mode of degradation)..."

3.3 Relevance: "With respect to the mode of degradation, ..."

3.3 Relevance; “Next to the evaluation of the degradation rate and mode of degradation...”

3.4.1 research strategy: “”...characterization of the mode of degradation”

3.4.1 research strategy: “...on rate and mode of degradation..”

A.1 : “...on rate and mode of degradation...”

A.2 ”...characterization of the mode underlying the degradation...”

3.3 Reactie: Met het oog op de toepassing waarvoor de huidige materialen worden onderzocht, heeft het theoretisch de voorkeur om de degradatie te bepalen binnen de specifieke situatie waarvoor en waarin het uiteindelijke biomateriaal geplaatst zal worden. Dit impliceert een degradatiestudie van een poreuze structuur, met anatomisch correcte afmetingen, binnen het kniegewricht, onder belastende omstandigheden. Dit experiment zal echter, vanwege praktische overwegingen, plaats moeten vinden in een groter diermodel, waarnaast er ook meer dieren gebruikt zullen moeten worden in verband met de beperkte plaatsingsmogelijkheden van de verschillende materialen. De vraag is of dit recht doet aan de te beantwoorden vraag/vragen en of we niet af kunnen met een simplistisch(er) (dier-)model.

Onze, te toetsen, verwachting is dat de netwerken degraderen via oppervlakte degradatie. Deze oppervlakte degradatie zal verlopen via enzymatische processen waarvoor cellen verantwoordelijk zijn die worden aangetrokken tijdens een inflammatoire respons. Het type en de omvang van deze cellulaire response is voor een deel afhankelijk van het biomateriaal zelf en niet louter van de locatie, of dit nu ectopisch plaats vindt of intra-articular (in een gevasculariseerd gebied). We verwachten dus dat, hoewel ectopische plaatsing van de implantaten theoretisch niet het meest ideaal is, dit wel degelijk kan worden beschouwd als een voorspeller van de degradatie in het kniegewricht. De dikte van het implantaat is voor het gedrag/mode/wijze van degradatie minder van belang dan bij een oppervlak degradatie in vergelijking met een bulk degradatie. Het is inderdaad wel zo dat het oppervlak (in verhouding tot het volume) wel een rol zal spelen bij de absolute snelheid van de degradatie. Daarnaast is het voordeel van ectopische plaatsing dat 1) de resultaten beter vergeleken kunnen worden met andere, eerder geteste, biomaterialen en 2) de resultaten beter gebruikt kunnen worden mocht er overwogen worden het geteste biomateriaal te gebruiken binnen andere toepassingen.

Actie: toegevoegd in sectie 3.4.1: In this experiment we will address degradation of the networks subcutaneously instead of addressing it in its intended location of future use (intra-articular in the knee joint). We assume that similar cell mediated processes, triggered by an inflammatory response, responsible for the expected surface degradation will be present in both locations (either subcutaneously as well as in a well vascularized region of the knee joint). So, we assume that the information obtained from the subcutaneous degradation study can be, in part, translated to an intra-articular environment.

Description of Animal Procedures:

-A Reactie: De precieze afmetingen van het implantaat ontbreken momenteel in de huidige beschrijving en een schatting van de te gebruiken afmetingen zal worden toegevoegd.

Actie: toegevoegd in sectie A1: (dimensions \pm 20x10x0.5 mm (lxbxh))

-B Reactie: Bij het schrijven van het project proposal zijn we voor het bepalen van het aantal benodigde dieren uit gegaan van onze eerdere ervaringen met soortgelijke experimenten. Waarbij we bij het opstellen van het werkprotocol een gedegen sample size berekening zullen uitvoeren. De onderbouwing voor het gebruik van verschillende tijdstippen wordt beschreven in sectie A2 binnen animal procedures. Hoeveel tijdstippen we uiteindelijk willen hanteren ontbreekt hier inderdaad. In het huidige experiment zullen er vijf tijdstippen zijn, per tijdstip zullen we naar schatting 8 ratten nodig hebben om een relevante afname in massa aan te kunnen tonen tussen twee onafhankelijke metingen op verschillende tijdstippen.

Actie:

-toevoegen aan sectie A2: We will apply 5 time points, divided over early and late time points.

-Veranderen aan sectie A3: will need 8 animals per time point (with 5 time points we will need 40 animals in total) to be able to demonstrate a clinical meaningful loss in mass with statistical significance (a more detailed sample size calculation will be performed prior to the start of the experiment).

-H. Reactie: We gebruiken isoflurane als anesthesia en carprofen als analgesie.

Actie: toegevoegd in sectie H3: (anesthesia by using isoflurane, and perioperative pain management by using carprofen)

-J. Reactie: De incidentie van humane eindpunten was niet ingevuld omdat we naast de standaard humane eindpunten geen experiment specifieke eindpunten verwachten. De standaard humane eindpunten worden uiteraard meegenomen. Dit zal alsnog expliciet worden vermeld in de aanvraag, waarin we ook meenemen dat de verwachte incidentie ervan lager is dan 1%.

Actie: J1: Yes

J2: We will apply general humane endpoints according to 'OECD Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation' (OECD Guidance Document 19, 2000)

J3: The risk for developing an infection is limited, therefore the expected incidence of humane endpoints is smaller than 1%.

-K. Reactie: Indien het ongerief van een dier dat onder narcose geopereerd wordt en daarna weer ontwaakt matig i.p.v. licht is (ongeacht de duur en de aard van de ingreep) nemen we deze aanbeveling graag over.

Actie: K1: moderate

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- Datum: 15-09-2015
- Strekking van de vragen:
- U verwijst voor de humane eindpunten naar 'OECD Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in

Safety Evaluation'. De humane eindpunten die hierin beschreven zijn liggen erg ver weg, en in de meeste gevallen is het niet te rechtvaardigen om de dieren te laten zitten totdat het zo wordt. Zou u met de IvD willen overleggen over de te hanteren humane eindpunten en deze aanpassen?

Datum antwoord: 16-09-2015

- Strekking van de antwoorden:
 - De te hanteren humane eindpunten zijn in overleg met de IvD 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 determine the in vivo degradation behavior (rate and underlying mode of degradation) of poly (TMC) / e-caprolactone based networks' en 'to study the in vivo tissue response of these networks'. Een beschadigde meniscus leidt vaak tot pijn en vocht in de knie en onbeweeglijkheid van het kniegewricht. Een therapie waarbij de meniscus behouden blijft (zoals hechten) geeft de beste resultaten op de lange termijn, maar is meestal niet mogelijk. De meest toegepaste therapie, namelijk (gedeeltelijke) verwijdering van de meniscus, leidt tot kraakbeenslijtage waardoor op de lange termijn een knieprothese nodig kan zijn. De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken of de onderzochte polymeer netwerken mogelijk toegepast kunnen worden om (delen van) een meniscus tijdelijk te vervangen totdat de meniscus weer is aangegroeid. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapieën voor mensen met een beschadigde meniscus. Gezien de hoge prevalentie van deze aandoening en de ermee gepaard gaande invaliditeit acht de DEC het belang van de doelstelling substantieel.
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 de biocompatibiliteit en de wijze van degradatie van de polymeer netwerken, en geeft een indicatie van de mogelijke toepasbaarheid als tijdelijke vervanging van (delen van) een meniscus.

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 subcutane plaatsing van biomaterialen en het herstel daarvan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde operatie onder algehele anesthesie in als matig, met daarbij de opmerking dat het een relatief lichte ingreep betreft, die normaal gesproken gevolgd wordt door een ongecompliceerd herstel. Het ongerief als gevolg van het doden onder anesthesie is terminaal. Het cumulatief ongerief voor de ratten 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. De degradatie van polymeer netwerken kan niet nagebootst worden in vitro omdat nog niet bekend is welke processen hierbij betrokken zijn.
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 meerdere implantaten per rat aan te brengen wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 40 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. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. De dieren krijgen adequate pijnbestrijding, en worden in tweetallen gehuisvest. Wanneer de onderzoekers minder implantaten per dier zouden aanbrengen, zou het ongerief voor een individueel dier wel iets afnemen, maar niet substantieel verminderen. Tegelijkertijd zouden er meer dieren nodig zijn om dezelfde onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. De commissie is het eens met de keuze die de onderzoekers hierin hebben gemaakt ten faveure van vermindering van dierproeven. De onderzoekers hebben verder op grond van goede argumenten besloten om hun onderzoeksvraag te beantwoorden door het subcutaan implanteren van de materialen. Plaatsing van de implantaten in het kniegewricht zou tot aanzienlijk meer ongerief leiden. Ook in dat opzicht is er sprake van verfijning. 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 biocompatibiliteit en wijze van degradatie van de polymeer netwerken bij ratten. De resultaten zullen onder andere een indicatie geven of deze polymeer netwerken op termijn gebruikt kunnen worden als tijdelijke vervanging van (delen van) een meniscus. Het belang van de ontwikkeling van nieuwe biomaterialen ter ondersteuning van de regeneratie van menisci acht de DEC substantieel,

gezien de prevalentie van meniscusschade en de daarmee gepaard gaande invaliditeit op korte en langere termijn.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de onderhuidse implantatie van de polymeer netwerken en 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.

Radboud universitair medisch centrum
Concernstaf, sectie Kwaliteit en Veiligheid

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

Geert Grooteplein 10

www.radboudumc.nl

KvK 41055629/4

Geert Grooteplein 10
Postbus 9101,
6500 HB Nijmegen

Datum
12-10-2015

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] als gemachtigde van de vergunninghouder. Hiervoor AUB het bij u bekend e-mailadres [redacted] en **hierboven vermelde postadres** te gebruiken.

Om verwerking door de financiële afdeling mogelijk te maken verzoeken wij u **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: 2015-0087
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(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
AVD103002015275

Bijlagen

2

Datum 14 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 12 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015275. 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: arts onderzoeker in opleiding
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? 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: 8 november 2015
Geplande einddatum: 8 november 2017
Titel project: In vivo degradation and tissue response of poly(TMC)-E-caprolacton based networks
Titel niet-technische samenvatting: Een studie naar de onderhuidse weefselreactie op, en de afbraak van, poly(TMC)-E-capr
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:

12 oktober 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
AVD103002015275

Bijlagen

2

Datum 14 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 14 oktober 2015

Vervaldatum: 13 november 2015

Factuurnummer: 15700275

Ordernummer: 040823/461220/2015-0087

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015275	€ 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
AVD103002015275

03 DEC 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 12 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In vivo degradation and tissue response of poly(TMC)-E-caprolacton based networks" met aanvraagnummer AVD103002015275. 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 geldt de voorwaarde zoals genoemd in de vergunning. Deze voorwaarde is een algemene voorwaarde. U kunt met uw project "In vivo degradation and tissue response of poly(TMC)-E-caprolacton based networks" starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 december 2015 tot en met 8 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 9 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. 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.

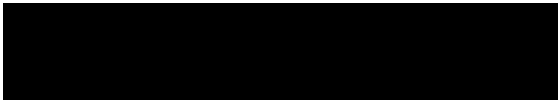
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

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:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv 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 3 december 2015 tot en met 8 november 2017, voor het project "In vivo degradation and tissue response of poly(TMC)-E-caprolacton based networks" met aanvraagnummer AVD103002015275, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is arts onderzoeker in opleiding. Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 14 oktober 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 december 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 december 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 oktober 2015, ontvangen op 12 oktober 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
In vivo degradation and tissue response of poly(TMC) based networks in rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / niet vermeld	40	Matig / moderate	

Voorwaarden

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

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 aanneemelijk 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: donderdag 3 december 2015 10:49
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: Beschikking 275
Bijlagen: DEC advies.pdf; Beschikking 275.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze beschikking is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl



.....

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

.....

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 7 december 2015 16:07
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Terugkoppeling aanvraag AVD103002015275

Beste DEC,
Enige tijd geleden ontvingen wij een advies van u betreffende aanvraag AVD103002015275 (A study to identify the best suited material for meniscus tissue engineering).

Bedankt voor uw heldere en goed onderbouwde advies.

De CCD heeft uw advies opgevolgd en het project vergund, met enkel toevoeging van een algemene voorwaarde (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 ter informatie, u hoeft niets te doen.

met vriendelijke groet,

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
	NTS2015301								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlagen beschrijving dierproeven 1,2,3				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Factuurinformatie				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	

04 NOV. 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 / 301 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	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>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10
		Postbus	9101, t.a.v. [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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Professor
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> 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	Postdoc
		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 0 1 _ 1 2 _ 2 0 1 5
- Einddatum 3 1 _ 1 1 _ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Towards treatment for pheochromocytoma
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Op naar een behandeling voor bijnierkanker
- 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.
- 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:

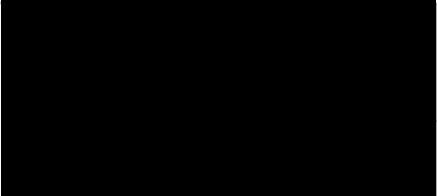
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 02 - 11 - 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.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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Towards understanding and treatment for pheochromocytoma |

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 or 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.

Patients with pheochromocytoma have tumours that originated from chromaffin cells in the adrenal gland. Chromaffin cells are a neuro-endocrine cell type and produce adrenaline or noradrenaline, also called epinephrine and norepinephrine, respectively. Every year, between 100 and 150 new pheochromocytoma cases are reported in The Netherlands. About 60 percent of these cases can be explained by a mutation in one of 12 identified genes, which can cause pheochromocytoma formation when mutated. The vast majority of the mutations are hereditary, meaning that the patient has a heterozygous mutation in one of these 12 genes and the wild type allele is hit by a somatic mutation later in life. This group of genes can be divided into two clusters. Cluster 1 includes genes involved in hypoxia response, while the more heterogeneous Cluster 2 encompasses genes causing increased kinase signaling when mutated.



Currently, there is no effective treatment for patients with pheochromocytoma other than removal of a tumour when operable. Insight in the mechanisms causing pheochromocytoma is urgently needed to develop therapeutics to cure this disease. Gaining this insight is difficult to achieve, because there are no proper cell and animal models for pheochromocytoma. Zebrafish have proven to be an excellent model for studying cancer. Zebrafish develop cancer spontaneously, after mutagen exposure and through transgenesis. The tumours resemble human cancers at the histological, gene expression and genomic levels. The ability to carry out in vivo imaging, chemical and genetic screens, and high-throughput transgenesis offers a unique opportunity to functionally characterize the cancer genome. Zebrafish transgenic tumor models represent an alternative

vehicle for drug development. Progress achieved to date in genetic engineering will establish the zebrafish as one of the most versatile animal models for cancer research [10, 11].

We want to establish animal models that enable us to investigate the underlying molecular pathways causing pheochromocytoma, to study the progression of the disease, and to develop therapeutics against this disease. We plan to generate zebrafish mutant strains for [REDACTED]

[REDACTED]. In the remainder of this application we will refer to this group of genes as pheochromocytoma-related genes.

Considering the time span of our project and the workload of the described experiments, we plan to generate zebrafish mutant strains for maximally 4 genes. We will base the selection of the genes on the occurrence of the mutated form in patients, the degree of conservation in zebrafish, and the number of patients with a malignant form of pheochromocytoma. In addition to using the zebrafish mutant strains to study the molecular pathways underlying this disease, we also want to use our generated mutant strains to test potential therapeutics. This will be done with larvae of 5 days post fertilization (dpf) or younger. Since no CCD approval is needed for these developmental stages, we do not discuss the testing of therapeutics here in detail. We will generate three different mutations per pheochromocytoma-related gene, all with the newest CRISPR/Cas9 approaches. To study the **fundamental** disease-causing molecular pathways we will generate two whole-animal mutations, one knock out mutation and one patient-mimicking mutation. **These mutant strains will give us valuable insights in the basic processes that are involved in the establishment of pheochromocytoma. The straightforward procedure we use for the generation of these mutant strains has been used by multiple research groups and we therefore do not foresee any difficulties during that procedure.** We elaborate on the generation of these mutant strains and the experiments we will perform on them in animal procedure 1. To date for only one pheochromocytoma-related gene, Von Hippel Lindau (VHL), zebrafish whole-animal mutants have been described [14]. These mutants display several aspects of the VHL disease, but die at 8 to 11 days old. We hypothesize that for the investigation of tumour development it is necessary to obtain zebrafish with a homozygous mutation in the chromaffin cells only, like in the patient. We therefore also plan to generate chromaffin cell-specific mutations for the selected pheochromocytoma-related genes. **For this purpose, we need to search for a promoter that expresses specifically in the chromaffin cells and we will use a procedure that was recently published and is not (yet) widely used. These two aspects result in a higher risk profile for the generation of the chromaffin cell-specific mutant strains.** The generation of these mutants and the experiments to examine these strains are described in animal procedure 2.

Finally, we want to set up a cell model for pheochromocytoma. We will do this by mutating [REDACTED] in a mouse adrenal cell line, [REDACTED], and by culturing patient-derived fibroblast with two mutated alleles of SDHB. If we are able to successfully develop one or both of these two cell models, we would like to transplant these cells lines with graft in mice to enable measurement of tumour growth and metastasis within a mammalian animal model (animal procedure 3). We will use a published procedure for these experiments [15]. Currently, there is no graft mice model for this type of cancer.

This research project is funded by the [REDACTED]. Prior to granting this research project, the project proposal was positively assessed by an external board of prominent scientists in the cancer field.

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
3. Schmidt, M., et al., *Clinical value of somatostatin receptor imaging in patients with suspected head and neck paragangliomas*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002. 29(12): p. 1571-80.
 4. Amar, L., et al., *Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma*. J Clin Oncol, 2005. 23(34): p. 8812-8.
 5. Gimenez-Roqueplo, A.P., *New advances in the genetics of pheochromocytoma and paraganglioma syndromes*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1073: p. 112-21.

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
10. White, R., K. Rose, and L. Zon, *Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward*. Nat Rev Cancer, 2013. 13(9): p. 624-36.
 11. Barriuso, J., R. Nagaraju, and A. Hurlstone, *Zebrafish: a new companion for translational research in oncology*. Clin Cancer Res, 2015. 21(5): p. 969-75.

- [REDACTED]
- [REDACTED]
14. van Rooijen, E., et al., *Zebrafish mutants in the von Hippel-Lindau tumor suppressor display a hypoxic response and recapitulate key aspects of Chuvash polycythemia*. Blood, 2009. 113(25): p. 6449-60.
 15. Ahmed, S.U., et al., *Generation of subcutaneous and intrahepatic human hepatocellular carcinoma xenografts in immunodeficient mice*. J Vis Exp, 2013. (79), e50544, doi:10.3791/50544.

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 objective of this project is to generate animal models **to gain insight in the molecular mechanisms behind the emergence and development of** pheochromocytoma. No proper in vivo model has been described for this type of cancer to date. Attempts to generate a mice model for pheochromocytoma were unsuccessful so far (Lepoutre-Lussey et al., 2015). Animal models for pheochromocytoma will enable us to investigate the underlying molecular pathways of the disease, the progression of the disease, and create the opportunity to develop therapeutics.

These objectives are achievable because we are working within a research group with a track record of projects on ;
(). We already have experience with the CRISPR/Cas9 technique (). We work together on this project with an internist who specialized in pheochromocytoma. We are in contact with the researchers who generated and analyzed the VHL mutant zebrafish and we have a close collaboration for the graft mice work with a research group, who are experts in that field. In addition, we have an exquisite zebrafish facility with all the expertise and equipment we need for this project.

3.3 Relevance

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

The scientific relevance of this study is that it will yield fundamental insight in the modes of action causing pheochromocytoma. The exact pheochromocytoma-causing molecular processes are poorly understood. The social relevance of this study is that the generation of animal models for pheochromocytoma allows us to improve our understanding of the disease's aetiology and to test therapeutics against this non-curable type of cancer. Currently, 100 to 150 new pheochromocytoma patients are reported in The Netherlands each year. The majority of these patients suffers from hypertension, migraine, palpitation and sweating. Patients with malignant pheochromocytoma have a poor prognosis.

3.4 Research Strategy

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

To study the underlying processes of the formation of pheochromocytoma in zebrafish, we will generate knock out and patient mutant strains of pheochromocytoma-related genes with CRISPR/Cas9. The patient mutation will mimic a mutation that was identified in a patient and is often a small deletion or amino acid substitution and will probably lead to a (partial) loss of function of the protein. We will carefully study the phenotype of homozygous mutants, both for anticipated characteristics and in an unbiased manner with a microarray (Animal procedure 1). These fish will be used

to gain fundamental insight in the underlying molecular pathways causing the disease. In parallel, zebrafish will be generated carrying a heterozygous mutation combined with a tissue-specific somatic mutation in the wild type allele in the interrenal gland. These zebrafish will be homozygous mutant for a pheochromocytoma-related gene in chromaffin cells only, similar to the situation in patients. These zebrafish will be used to study the phenotype of the interrenal gland and they will be investigated for metastatic features (Animal procedure 2). The two types of mutants, whole-animal mutants and tissue-specific mutants, are generated for separate purposes. The whole-animal mutants allow us to study the underlying molecular mechanisms of pheochromocytoma. This will yield insight in the fundamental pathways involved in the tumour formation and development. These mutants will also be used for drugs screens before they are 6 dpf. This cannot be done in the tissue-specific mutant, because that strain has only a very small portion of mutated cells and all other cells of their body do not have the mutation. The tissue-specific mutant strains are generated to study tumour growth and metastasis. For these purposes we want to have a mutant that closely resembles the patient situation, like the tissue-specific mutant does. As is the case in humans, it is very likely that the whole-animal mutant zebrafish do not survive long enough to develop primary and metastatic tumours. **On top of that, we expect that the risk factor for the generation of whole-animal mutants is low, while it will be higher for the generation of the tissue-specific mutants.**

Zebrafish have an interrenal gland instead of an adrenal gland. The only difference is the location of the gland. Besides that, the cell type, chromaffin cells, and the adrenalin/noradrenalin-producing function of the interrenal gland are exactly the same as the cell type and function of the mammalian adrenal gland.

Next to the zebrafish work, we will study the molecular pathways causing pheochromocytoma in a mouse nor-adrenergic chromaffin adrenal cell line,

After knock out of [REDACTED] and careful characterization of the cell line, we wish to transplant these cells into mice to study the tumour development in a mammalian model system. This cell line without the [REDACTED] mutation will serve as a negative control. We also want to do this for patient-derived fibroblast cells carrying a [REDACTED] mutation in both alleles, again after careful characterization of the cells. As a negative control, these cells will be transfected with a wildtype [REDACTED] construct. All cells will be supplemented with a bioluminescence construct to facilitate the distinction of the transplanted cells from other cells. Neither of the cell lines has been grafted before, therefore some initial experiments are needed to optimize the procedure for these cells. The transplantation will be done by performing a (xeno)graft in mice as was previously described (S. Sivanand *et al.*, 2012) (Animal procedure 3). If possible, the [REDACTED] cells will be transplanted in immune-competent mice. The human fibroblast cells have to be transplanted in the immune-deficient nude mice. After successfully grafting the cells, the tumour growth and metastasis will be monitored.

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 pheochromocytoma-related mutant zebrafish strains can be readily made using the latest CRISPR/Cas9 techniques. The knock out and patient mutant strains will be made by injection of CRISPR/Cas9 reagents into the one-cell embryo. Once we obtained a heterozygous mutant, we will cross it out with wild type zebrafish and cross the progeny in to generate homozygous offspring. Heterozygous pheochromocytoma-related mutant zebrafish are not anticipated to be different from wild type zebrafish, as is the case in humans. For the generation of chromaffin cell-specific null mutants, the heterozygous mutant will acquire a transgene expressing the CRISPR/Cas9 reagents in the chromaffin cells only. In that way, zebrafish will be created that can carry a homozygous mutation in the chromaffin cells and not in other cells.

After establishing the pheochromocytoma-related mutant zebrafish strains, the homozygous mutants will be subjected to a series of experiments (Animal procedure 1). The mutants will be analysed for gross histological changes. The survival time, the heart rate, and stroke volume will be scored for these homozygous mutants compared to their wild type siblings. We anticipate that the mutants will have shorter lifespan, increased heart rate, and increased stroke volume as this is the case for the VHL mutant zebrafish (Van Rooijen *et al.*, 2009). We will check with EdU staining whether there are any extra cell divisions occurring in the mutants. If possible, we will compare the metanephrine and normetanephrine levels of mutant and wild type zebrafish. Metanephrine and normetanephrine are stable waste products of the instable adrenaline and noradrenaline. If it turns out that it is not possible to measure metanephrine and normetanephrine in zebrafish samples, we will measure adrenaline and noradrenaline levels. In patients, metanephrine and normetanephrine levels are often elevated in their blood and urine because of the increased number of chromaffin cells in the tumour tissue.

To gain insight in the underlying molecular mechanisms of the disease we would like to perform a microarray on mRNA obtained from the mutant zebrafish and wild type siblings for all our mutant strains. With this experiment we will gain unbiased information of the changes in gene expression on a genome-wide level.

Besides performing the same analyses as described for the homozygous mutants, we will perform a series of additional experiments with the tissue-specific mutant strains. The levels of metanephrine and normetanephrine (or adrenaline and noradrenaline) will be determined in the urine and blood and compared to wild type siblings. The interrenal gland of the tissue-specific mutants will be analysed for histological changes and alterations in expression levels of hypoxia-related genes. We will look for features of metastasis in the interrenal-specific mutants by using a fluorescent HIF reporter, which is highly expressed in tumour tissue (Animal procedure 2).

We plan to use both graft mice models to investigate tumour development and metastasis. We will inject mutated tsAM5NE cells and patient-derived fibroblast cells into the of the mice and monitor tumour growth and metastasis. We will perform histological analysis, like analyzing the formation of new blood vessels.

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

Our goal is to generate zebrafish and cell models that will give us insight in the basic mechanisms behind the emergence and development of pheochromocytoma and models that mimic pheochromocytoma tumours to study the progression of the disease.

For the zebrafish, our first milestone will be to see whether zebrafish carrying a homozygous mutation in a pheochromocytoma-related gene show the anticipated phenotype. These homozygous zebrafish will provide us insight in the fundamental processes underlying this disease. A second

milestone will be to see whether tissue-specific mutants develop tumours and can be used to study the aetiology of this chromaffin cell-specific cancer. These zebrafish will be generated in parallel to the homozygous mutants described above. The studies in mice will depend on whether we can obtain cells that phenocopy pheochromocytoma tumours. Having such cells is a third milestone and a prerequisite for transplantation of these cells into mice. The graft mice model, the final milestone, will enable us to study the tumour growth and metastatic features of pheochromocytoma.

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	Analyzing the zebrafish phenotype of homozygous whole animal mutants
2	Examining the interrenal phenotype of the tissue-specific mutants
3	Transplanting cells in mice

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Analyzing the zebrafish phenotype of homozygous whole animal mutants

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.

Mutant strain generation

Per pheochromocytoma-related gene, we want to generate a knock out mutant strain and one strain carrying a patient mutation. For these two whole-animal mutant strains we wish to generate heterozygous strains. The knock out strain will be used to examine the phenotype in absence of the protein of interest and gain basic knowledge on what processes it is involved. The patient mutation often is a small deletion or amino acid substitution and will probably lead to a (partial) loss of function of the protein. The corresponding zebrafish strain will closer resemble the tumour and will also be used to confirm the phenotype of the knock out strain.

We will generate all these mutant strains with the latest CRISPR/Cas9 technology. CRISPR/Cas9 enables us to generate complete null mutations and the exact same mutations as observed in patients. The use of CRISPR/Cas9-induced mutations also allows us to investigate the long term effects of mutations. We will combine elements of previous studies to maximize the efficiency of our approach and minimize inducing unintended mutations elsewhere in the genome (Chang *et al.*, 2013; Gagnon *et al.*, 2014).

Phenotypic analysis of homozygous whole animal mutants

We wish to examine the phenotype of the homozygous knock out and patient mutant zebrafish. For one of the pheochromocytoma-related genes, VHL, the larval phenotype has been described in some extent. Because the mutations affect the same molecular pathway, we expect to find similar phenotypes for the mutant strains of the other pheochromocytoma-related genes. VHL is one of the most downstream components of the pathway and therefore might result in a stronger (direct effect) phenotype than when a more upstream component is mutated (indirect effect). The phenotypic aspects we expect based on the VHL mutant phenotype are shorter survival time, increased heart rate, and increased stroke volume (experiment 1).

[REDACTED]. We also want to investigate the metanephrine and normetanephrine levels in the mutants and wild type siblings, since these are increased in patients (experiment 3).

Other parameters we want to determine for mutants of [REDACTED]

[REDACTED] is an unbiased approach to gain insight in the proteins involved in this type of cancer, we would like to perform a microarray experiment on mutant larvae and wild type siblings and determine the changes in expression level on a genome-wide scale (experiment 6).

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

Mutant strain generation

Since this DEC application only concerns the handling of zebrafish after 5 dpf, we focus here exclusively on describing the animal procedures for zebrafish of 6 dpf and older. The CRISPR/Cas9 procedure is performed in the embryos. Therefore, we do not describe the injection procedure in detail. For the knock out and patient mutants we will inject the CRISPR/Cas9 reagents in the one-cell embryo and genotype the zebrafish at 2 days post fertilization (dpf). We will select and grow up zebrafish with the desired mutation only.

Experiment 1

To determine the life span of the homozygous mutants the lethality will be scored daily. VHL mutants die after 8 to 11 days post fertilization (dpf) and we anticipate that other homozygous pheochromocytoma-related mutants have a similar life span. The heart rate and stroke volume of the mutants will be scored using a high speed video imaging set up. This will be done for larvae of 6, 8, and 10 dpf. If the pheochromocytoma-related mutants turn out to have a shorter or longer life span, we will adapt the time points accordingly.

Experiments 2-6

We want to measure EdU incorporation, [REDACTED], and genome-wide gene expression later than 5 dpf, but earlier than 2 days before the zebrafish die as determined in (1). For these measurements we will kill mutant and wild type at that stage.

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

We will reduce the number of animals by selecting the zebrafish with the desired mutation before 6 dpf and only let these mutants grow up. When available we will use published data to calculate the minimal number of animals needed to obtain significant results. For the survival time, the heart rate, and stroke volume we found published results (Van Rooijen *et al.*, 2009). Based on the standard deviation and the effect size of these results and an alpha of 0,05 and a power of 0,8, we calculated the number of animals needed with the statistics program Piface (Lenth, 2009). We lowered the expected effect size, because we anticipate that a non-functional VHL protein has a strong direct effect on the stabilization of HIFs, while this effect of other non-functional pheochromocytoma-related proteins is more indirect and therefore probably weaker. We will also use published data to estimate the number of animals needed to obtain enough material for the microarray procedure, [REDACTED]. We could not find evidence for metanephrine and normetanephrine measurements in zebrafish. We will perform a pilot study with the VHL mutants ourselves before the critical age of 6 days post fertilization (dpf).

B. The animals

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

We chose zebrafish as a model organism for several reasons. First, as described in the background of the project proposal, zebrafish have proven to be an excellent model for studying cancer (White *et al.*, 2013; Barriuso *et al.*, 2015). Second, zebrafish possess (potential) homologues of all the pheochromocytoma-related genes. Third, zebrafish have chromaffin cells. We will use the widely used wild type zebrafish strain AB.

Mutant strain generation

We estimate that we will need 50-80 zebrafish over 2 generations per stable knockout or patient mutant strain. Since zebrafish had an ancient genome duplication they often have two copies of a gene. This means we would maximally need 200–320 zebrafish per gene. We estimate that we will maximally generate mutant strains for four genes. This comes down to maximally 800–1.280 zebrafish in total for the mutant strain generation. $50 - 80$ (number of fish needed per mutant strain) $\times 2$ (zebrafish might have two homologs of a gene, diploid) $\times 2$ (knockout and patient mutant strain) $\times 4$ (max. number of genes to study) = 800 - 1.280

Phenotypic analysis of homozygous whole-animal mutants

We will use these mutant zebrafish strains for the following experiments:

1. For the life span experiment we will examine 30-40 mutant larvae and 30-40 wild type siblings per mutant strain. The heart rate and cardiac output will be scored with the same high speed video. Based on published data we calculated that we will need 25-40 mutant larvae and 25-40 wild type siblings per mutant strain (Van Rooijen *et al.*, 2009).
2. For the EdU incorporation and [REDACTED] we will need around 60-80 mutant zebrafish per mutant strain and a similar amount of wild type siblings.
3. The metanephrine and normetanephrine measurements have never been performed on whole-animal-lysates of zebrafish larvae. We are planning to do a pilot study to determine the number of larvae needed. We will start by using wild type and VHL mutant larvae of maximally 5 days old and test whether we can detect metanephrine and normetanephrine in their tissue and urine using mass spectrometry. Based on the outcome of this pilot study, we will decide how to measure these compounds.

5. The genome succinylation analysis will be done in triplo using mass spectrometry. Around 40-80 larvae are needed to gather enough material for a mass spectrometry sample (Zhang *et al.*, 2015). For each mutant strain this would mean 240-480 zebrafish for three samples and three controls.
6. For the microarray experiment we will need 50-80 zebrafish of both the homozygous mutant as the wild type siblings to obtain enough RNA for the procedure (Van Rooijen *et al.*, 2009). To confirm the microarray data we would like to perform in situ hybridization experiments for the genes that have an altered expression level in the mutants. We would like to do this for not more than 10 genes per mutant strains. For each staining 100 larvae are needed, of which 50 serve as a control (Chitramuthu and Bennett, 2013). In total, we would need up to 1160 fish per mutant strain.

In total up to 2.040 fish will be needed to perform all these experiments for the [REDACTED] mutant strains and maximally 1.480 fish for the [REDACTED] mutant strains. We plan to make a knock out and a patient mutant strain for each gene we want to investigate, meaning we would need maximally 4.080 fish larvae per gene. We estimate that we will not generate mutant strains for more than four genes for practical reasons, which would come down to max. 16.320 zebrafish.

2.040 (max. number of fish needed for all experiments) $\times 2$ (mutant strains per gene) $\times 4$ (max. number of genes to study) = 16.320

Together with the generation of the mutant strains the total number of fish needed is max. 17.600.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Danio rerio, strain AB mutated	Own breeding	16320	Probably larvae
Danio rerio, strain AB mutated	Own breeding	1280	Adult

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: Integrative aspects such as neo-vascularisation and effects of released hormones cannot be studied in cell culture. One of the pheochromocytoma-related genes, Von Hippo Lindau (VHL), has already been mutated in zebrafish (Van Rooijen *et al.*, 2009). Although the objective of that particular study was not related to pheochromocytoma, but to other aspects of the VHL disease, the mutated zebrafish exhibited the anticipated phenotype. Because VHL is acting in the same hypoxia-related pathway as the other Cluster 1 genes, we think zebrafish will be a good model organism for pheochromocytoma as well.

Reduction: We used statistics and published data to estimate the minimal number of animals needed. We reduce the number of animals by genotyping them at 2 dpf, so we can already select the fish with the desired mutation at that time point and only let these mutants grow up.

Refinement: The zebrafish will be housed in groups, the water in our facility is 26 to 28 degrees and is continuously refreshed, the zebrafish are fed twice a day, and the facility provides a circadian light-dark rhythm.

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

To minimise animal suffering we will monitor the zebrafish daily and perform the experiments as soon as the zebrafish reached the age of planned analysis. We will kill them if a humane endpoint is reached. Adverse effects on the environment are not anticipated.

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.

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.

The homozygous mutant larvae might experience pain, because they will probably die in the experiment in which the survival time is determined. For most of the other experiments they will live until a few days prior to their expected death. It is not possible to keep them under constant anaesthesia during their development.

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?

Like in patients, the fish might suffer from high blood pressure. We do not expect any other adverse effects on the welfare of the zebrafish.

Explain why these effects may emerge.

This is a symptom of pheochromocytoma.

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

It is not possible to decrease the blood pressure.

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 zebrafish will be killed when the zebrafish show clear signs of physical or behavioral distress due to the size or location of a tumour. Also, if fish show abnormal development, like curved shape, or abnormal swimming behavior the fish will be killed.

Indicate the likely incidence.

This is difficult to indicate, because there are no pheochromocytoma fish models. We expect that the vast majority of the fish will be killed after the experiments and not reach a humane endpoint.

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 expect that the heterozygous knock out and patient mutant strains will not experience any discomfort, because humans carrying a heterozygous mutation in a pheochromocytoma-related gene do not exhibit any symptoms. Therefore, we assign these zebrafish strains to the category mild discomfort and expect that we can confirm after two generations that these zebrafish indeed do not show any signs of discomfort. The collection of materials zebrafish is assigned to the non-recovery category. The homozygous mutant zebrafish are assigned to the category moderate and we do not expect discomfort for the wild type siblings. In total, 53% of the fish are categorized as experiencing mild discomfort and 47% moderate discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No

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

It is likely that there will be mutants generated that carry a mutation in somatic cells only and not in their germ cells. These zebrafish cannot transmit the mutation to their progeny and can therefore not be used in our project and thus will need to be killed. This is a general drawback of the CRISPR/Cas9 technology in zebrafish. There is no method to confirm that the zebrafish developing from the injected embryos carry the intended germ line mutations other than determining whether they pass the mutation on to their offspring. For several experiments described above we need to collect lysates, RNA, or protein from the larvae. This can only be collected after killing them.

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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Examining the interrenal phenotype of the tissue-specific mutants</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Examining the interrenal phenotype of the tissue-specific mutants
Serial number	Type of animal procedure					
2	Examining the interrenal phenotype of the tissue-specific mutants					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

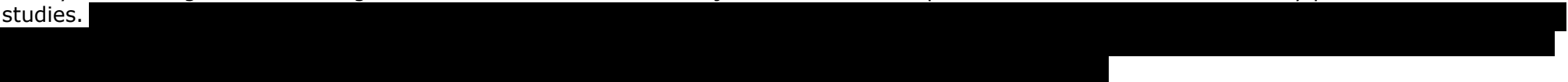
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Mutant strain generation

Per gene, we want to generate one mutant strain with a chromaffin cell-specific mutation. The tissue-specific mutant strain is the best representation of the situation in the patient and will serve as a model to study tumour growth and metastasis, while the underlying molecular mechanisms can be studied best in the whole-animal mutants. We will generate these mutant strains with the latest CRISPR/Cas9 technology. For the tissue-specific mutants we will generate transgenic zebrafish with a tol2 cassette that can express the CRISPR/Cas9 reagents of which the Cas9 protein will be expressed from a chromaffin cell-specific promoter. We will combine the tissue-specific mutant with the heterozygous whole animal mutant background to resemble the genotype that is most frequent in patients. This method for generation of tissue-specific mutants was previously published (Ablain *et al.*, 2015).

Phenotypic analysis of tissue-specific mutants

We would like to investigate the development of pheochromocytoma using our tissue-specific mutants. In these pheochromocytoma-related mutants we want to determine the metanephrine and normetanephrine levels in their blood and urine compare the values with wild type siblings. Swimming water containing urine measurements will be performed every week and will be the indicator of when the zebrafish develop a tumor. Once they have a tumour, we want to analyse the morphology and characteristics of the interrenal gland of these mutants. We will therefore isolate the kidneys containing the interrenal gland from these mutants and subject them to RNA expression and immunohistochemistry protein localization studies.



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

Mutant strain generation

Since this DEC application only concerns the handling of zebrafish after 5 dpf, we focus here exclusively on describing the animal procedures for zebrafish of 6 dpf and older. The CRISPR/Cas9 treatment is done in the embryos. Therefore, we do not describe the injection procedure in detail. The selection of transgenic fish for the tissue-specific mutant is done within the first five days post fertilization by selecting larvae that express a fluorescent injection marker encoded by the transfected CRISPR/Cas9 construct.

Phenotypic analysis of tissue-specific mutants

The zebrafish will be housed in standing water for 24 hours to collect urine. This will be done every week until elevated metanephrin or normetanephrin levels are detected, which is a sign that the fish has developed a chromaffin cell tumor. For urine collection adult fish will be housed individually, while it might be necessary to house larvae in groups to be able to collect enough urine. The blood for measuring the metanephrine and

normetanephrine levels of the tissue-specific mutants and wild type siblings will be collected from adult fish once they show increased levels of metanephrine and normetanephrine in their urine. The blood will be collected during a terminal procedure by cutting the tail while the animals are under anaesthesia. Because it is not known whether metanephrine and normetanephrine concentrations can be measured in zebrafish blood, we will first perform a pilot experiment with VHL mutants and wild type fish to determine this. We will subsequently collect the head kidneys including the interrenal gland of these adult mutants and wild type siblings.

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

We reduce the number of animals by selecting the transgenic zebrafish before 5 dpf and only let these mutants grow up. To be able to collect enough kidneys to perform RNA and protein stainings on we expect to need 100 mutant animals and 100 siblings per mutant strain. We anticipate we want to stain for several components of the pheochromocytoma-related pathways, as well as for multiple candidates that came out the microarray discussed in animal procedure 1. Per staining we will need around 40 kidneys, of which 20 will serve as a control sample. We expect to stain for maximally 10 mRNAs or proteins with each mutant strain, meaning we would need 400 fish. In total, we estimate that we will generate maximally mutant strains for four genes, which would come down to 1600 fish.

B. The animals

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

We will use the widely used wild type zebrafish strain AB. For the chromaffin cell-specific strains we expect we will need 15 zebrafish per gene for the first generation of zebrafish which is unstable and up to 400 zebrafish of the second stable generation of which we want to collect blood and tissue from at the adult stage. Since we are planning to generate mutants for max. four genes, we will need maximally 1660 fish. For the pilot experiment to detect the levels of metanephrine and normetanephrine in the blood of wildtype zebrafish and fish treated with [REDACTED], we will need 240 fish. We calculated this number based on the fact that 5 microliter of blood can be collected from an adult zebrafish, 200 microliter of blood is needed as a sample for the mass spectrometry analysis, and we want to perform the experiment in triplo.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Danio rerio, strain AB, transgenic	Own breeding	1660	Adult
Danio rerio, VHL mutant	[REDACTED]	120	Adult
Danio rerio, wild type	[REDACTED]	120	Adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

C. Re-use

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: Integrative aspects such as neo-vascularisation and effects of released hormones cannot be studied in cell culture. One of the pheochromocytoma-related genes, Von Hippo Lindau (VHL), has already been mutated in zebrafish (Van Rooijen *et al.*, 2009). Although the objective of that particular study was not related to pheochromocytoma, but to other aspects of the VHL disease, the mutated zebrafish exhibited the anticipated phenotype. Because VHL is acting in the same hypoxia-related pathway as the other pheochromocytoma-related genes, we think zebrafish will be a good model organism for pheochromocytoma.

Reduction: We reduce the number of animals by selecting the fish with the desired mutation before 5 dpf and only let these mutants grow up.

Refinement: The zebrafish will be housed in groups most of the time, the water in our facility is 26 to 28 degrees and is continuously refreshed, the zebrafish are fed twice a day, and the facility provides a circadian light-dark rhythm.

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

To minimise animal suffering we will monitor the zebrafish daily and perform the experiments as soon as the zebrafish reached the age of planned analysis. We will kill them if a humane endpoint is reached. Adverse effects on the environment are not anticipated.

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.

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.

The chromaffin cell-specific mutant zebrafish might develop tumours and because of that may experience pain. To reduce the discomfort of these zebrafish we analyse them for the anticipated phenotypes as early as possible and will kill them as soon as possible afterwards or when they reach a humane endpoints. It is not possible to administer pain relief continuously to zebrafish.

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?

Depending on the size and location of the tumour and metastasized tumours, the fish might experience physical limitations. The fish might experience stress when they are housed individually to collect urine. Like in patients, the fish might suffer from high blood pressure. We do not expect any other adverse effects on the welfare of the zebrafish.

Explain why these effects may emerge.

Tumour formation and during the urine collection procedure the fish will be housed individually for 24 hours.

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

We will house zebrafish individually only when needed. There is no method to prevent the discomfort due to the development of cancer.

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 zebrafish will be killed when the zebrafish show clear signs of physical or behavioral distress, like abnormal swimming behavior, due to the size or location of a tumour. Also, if fish show abnormal development, like curved shape, the fish will be killed.

Indicate the likely incidence.

This is difficult to indicate, because the proposed experiments have never been done before. If the effects are as in humans, we expect that the chromaffin cell-specific mutant zebrafish will all develop tumours and that about 67% of the chromaffin cell-specific [REDACTED] mutants will have metastasized tumours. We expect that the vast majority of the fish will be killed directly after the experiments and not reach a humane endpoint.

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 tissue-specific mutants will likely develop pheochromocytoma that might metastasize and we therefore assign those strains (44% of the fish) to the category moderate discomfort. The procedure for the siblings (44%) includes individual housing, a procedure that is assigned to category mild. For blood collection the procedure is assigned to non-recovery (12%).

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.

It is likely that there will be mutants generated that carry a mutation in somatic cells only and not in their germ cells. These zebrafish cannot transmit the mutation to their progeny and can therefore not be used in our project and thus will need to be killed. This is a general drawback of the CRISPR/Cas9 technology in zebrafish. There is no method to confirm that the zebrafish developing from the injected embryos carry the intended germ line mutations other than determining whether they pass the mutation on to their offspring. Animals will also be killed to be able to collect blood and tissue from them.

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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>3</td><td>Transplanting cells in mice</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	3	Transplanting cells in mice
Serial number	Type of animal procedure					
3	Transplanting cells in mice					

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.

We are going to work on a cell model for pheochromocytoma. We will grow and develop two different cell lines for this purpose. We will use patient-derived fibroblasts with mutations in both [REDACTED] alleles and a mouse adrenal cell line, [REDACTED], carrying a [REDACTED] knock out mutation. As controls, we will supplement the fibroblast cell line with a [REDACTED] rescue construct and we will use the [REDACTED] cells with intact [REDACTED] genes. After careful characterization of these cell lines, we would like to graft them in mice. The fibroblast cells in nude immuno-incompetent mice and the [REDACTED] cells in immuno-competent mice if possible. We will first test if the cells are not rejected by the host mice, determine how many cells need to be injected, and whether a tumour mass is formed. If the cells are accepted and forming a tumour, we will study tumour growth and metastasis in these graft mice models. The primary outcome parameters are tumour growth and metastasis of transplanted cells.

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

For the graft procedure we will follow a protocol which has been published (Ahmed *et al.*, 2013). Mice will be anesthetized by inhalation with an isoflurane vaporizer. Mice will be placed on a warming pad, fur will be shaved, and the area will be sterilized using Betadine. Cells will be injected subcutaneously. Adrenal injection of cells is not possible, because the gland is too small. Bioluminescent imaging at the recently-established [REDACTED] [REDACTED] will be performed twice a week under anaesthesia. This allows us to monitor tumor growth over time (luciferase quantification) in these graft assays. The experiment will end when metastasis is observed.

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

We will use 12 mice per group for the final experiment only, in which the tumour growth and metastasis will be determined. We choose this number of animals because there are no data on which we can calculate the number of animals needed and it was shown that 12 animals per group provide the best change of significant results in a study [1].

1. Julious, S.A., *Sample size of 12 per group rule of thumb for a pilot study*. Pharmaceutical Statistics, 2005. Volume 4, Issue 4, pages 287–291

B. The animals

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

To investigate tumour growth and metastasis of cell lines we turn to mice models since they provide excellent graft models. We will use nude mice of the strain NOD/SCID for the fibroblasts, since these mice are immuno-deficient and the cells are from a different species. For the [REDACTED] cells we will use the widely used black six mice. Males and females will be injected at 4 to 6 weeks of age as done previously (Sivanand *et al.*, 2012). To determine whether the cells are not rejected and form a tumour mass we will use maximally 15 mice per cell line. In the final experiment, 30 mice will be used per cell line, 12 for either the patient-derived cells or the mouse adrenal [REDACTED] knock out cells, 12 for the negative control group and 6 for the positive control group.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice strain NOD/SCID	own breeding	45	4 - 6 weeks old
Mice strain C57BL/6	own breeding	45	4 - 6 weeks old

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 alternatives are available to answer our research question about tumour growth and metastasis of pheochromocytoma. Integrative aspects such as neo-vasculariation and effects of released hormones cannot be studied in cell culture.

Reduction: Since this is the first study with these cells in mice, we will use 12 mice per group. It was shown that 12 animals per group provide a good change of obtaining significant results (Julious, 2005).

Refinement: Mice will have ad libitum access to food and water for the duration of the experiment. Mice will be housed in groups. Cage enrichment (shelters) will be supplied to reduce stress in the animals. The mice facility provides the mice with a 12 hour light - 12 hour dark circadian rythm. All these aspects will lead to minimizing the discomfort of the animals. The design and the duration of the experiment are such that the discomfort of the animals is as little as possible.

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

To minimise animal suffering the mice will be monitored daily. They will be housed in groups. **Anaesthesia** will be used just before and during surgery. Painkillers will be used afterwards. We will kill them if a humane endpoints is reached. We see no reason why adverse effects on the environment would occur.

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.

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.

Mice will be anesthetized by inhalation with an isoflurane vaporizer and buprenorphine will be administered by intraperitoneal (IP) injection immediately after surgery, while the mice are still anesthetized, and a second dose 12 hours after surgery. Mice will be placed on a warming pad, fur will be shaved, and the area will be sterilized using Betadine.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

All mice might possibly experience discomfort because of the location of a metastasized tumour. For the fibroblast xenograft mice, we do not expect any other effects on the welfare of the animals. The mice with the [REDACTED] cells might suffer from high blood pressure.

Explain why these effects may emerge.

The high blood pressure that might occur in the mice with [REDACTED] cells is caused by excessive production of adrenalin and/or noradrenalin by the grafted adrenal cells.

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

Metastasis will be frequently monitored. There are no measures to be taken against the high blood pressure.

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 mice will be monitored daily and evaluated for body weight and tumor growth by physical exam twice weekly. When the mice show obvious signs of discomfort, like tarnished fur and abnormal behaviour, they will be anesthetized with isofluorane, exsanguinated by cardiac puncture and killed.

Indicate the likely incidence.

We anticipate that the mice will be killed directly after the experiments and not reach a humane endpoint.

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 grafted mice are assigned to the category 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.

For the collection of tumour material the mice need to be 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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0098
2. Titel van het project: Towards understanding and treatment for pheochromocytoma
3. Titel van de NTS: Op naar begrip van en behandeling voor bijniertumoren
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: 21-07-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 04-08-2015 en 08-09-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 13-08-2015 tot 25-08-2015, van 15-09-2015 tot 22-09-2015, en van 12-10-2015 tot 16-10-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 25-08-2015, 15-09-2015 en 16-10-2015
 - advies aan CCD: 02-11-2015
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: 13-08-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Niet-technische samenvatting:**
 - 3.4 De doelgroep zal niet begrijpen wat het analogieprincipe inhoudt. Graag anders opschrijven of uitleggen.
 - 4.2 Uit de laatste zin is niet duidelijk waarom dit bijdraagt aan vermindering van het aantal proefdieren.
 - 4.4 De gegeven informatie is niet toereikend. Wat wordt er precies bekeken bij de proefdieren (bv. Ventilatiesnelheid?) en op welke manier leidt dat tot het beperken van de negatieve gevolgen voor het welzijn van de dieren (wanneer wordt er besloten tot welke actie?)

Project Proposal:

-3.1 Een onderbouwing waarom de zebravis goed bruikbaar is voor kankeronderzoek ontbreekt nog. In de bijlage voor dierproef 1 worden hiervoor referenties genoemd die te summier zijn (de naam van het tijdschrift en de vermelding van de pagina's ontbreken) om terug te vinden. De onderzoekers worden verzocht dit uitgangspunt meer uitgebreid (waarom vormen deze vissen een excellent model?) te onderbouwen onder 3.1.

-3.1 Het project is gereviewed en gefinancierd door de [REDACTED]. Heeft deze organisatie het project op wetenschappelijke wijze gereviewed?

-3.4 Indien er geen tumoren zouden ontstaan in de vissen met orgaanspecifieke mutaties (dierproef 2) lijkt er geen reden om dierproef 1 uit te voeren. De onderzoekers worden derhalve verzocht de volgorde van de dierproeven om te draaien en dit go/no go moment op te nemen in de aanvraag. Indien zij anderszins van mening zijn worden zij verzocht dit duidelijk en overtuigend te beargumenteren.

-3.4 De toelichting op de aan- of afwezigheid van bijnieren in zebravissen is verwarrend. Is een 'interrenal gland' hetzelfde als een 'adrenal gland' afgezien van de positie en de naam?

Description of Animal Procedures:

-DAP1 (DAP2 na gevraagde aanpassing)

*2. A. De onderzoekers hanteren een power van 0.9. Zij worden verzocht uit te leggen waarom de gebruikelijke power van 0.8 onvoldoende zou zijn.

*2.B. De bruikbaarheid van de zebravis als model voor kanker is onvoldoende toegelicht (zie ook de eerste vraag bij het project proposal).

*2. B. Het geschatte aantal dieren is gebaseerd op tetraploidie, terwijl de dieren diploid zijn.

*2. H. Continue pijnbestrijding bij vissen is wel mogelijk.

-DAP3.

*1.3 Het betreft niet alleen naakte muizen

*2.A.1. De [REDACTED] cellen worden niet in naakte muizen maar in immunocompetente C57BL/6 muizen getransplanteerd.

*2.A.2 Is injectie in de nier wel een goed model voor pheochromocytoom (in het protocol waarnaar wordt verwezen is sprake van 'renal cell carcinoma')? Waarom is injectie in de bijnier niet mogelijk? Waarom kiezen de onderzoekers voor het aanbrenge van een tumor onder het nierkapsel – hetgeen bij uitgroei van de tumor veel ongerief voor het dier veroorzaakt – en niet voor het aanbrenge van een subcutane tumor? Dit laatste is technisch eenvoudiger, minder belastend voor het dier en de tumorgroei is eenvoudiger te volgen.

*2.A.3. Kunnen de onderzoekers de keuze voor 12 muizen per groep duidelijker uitleggen? Geldt dit aantal voor alle mogelijke dierexperimenten?

*2.D Het onderdeel verfijning is niet adequaat beantwoord.

*2.J De onderzoekers dienen hier alleen humane eindpunten te noemen (tumorgrootte van 10 mm is een experimenteel eindpunt).

- Datum antwoord: 25-08-2015

- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

- 3.4 De zin is aangepast en het woord analogieprincipe is niet meer aanwezig in de bijgevoegde versie van de aanvraag.
- 4.2 Deze zin is nu verwijderd uit de aanvraag.
- 4.4 De tekst is uitgebreid.

Project Proposal:

- 3.1 Er is een stuk tekst toegevoegd over de zebravis als uitstekend modelorganisme voor kankeronderzoek. Ook is er een referentielijst toegevoegd.
- 3.1 Ja, onze aanvraag is uitgestuurd naar een commissie van vooraanstaande wetenschappers voor evaluatie. Nadat zij hun adviezen hadden uitgebracht en deze naar hun tevredenheid waren verwerkt in de aanvraag, heeft de ██████████ de beurs toegekend. Deze informatie is nu ook in de aanvraag verwerkt.
- 3.4 De twee typen mutanten, de algehele mutant en de weefselspecifieke mutant, worden voor verschillende doeleinden gemaakt. De algehele mutant wordt gemaakt om de onderliggende signaal transductie routes te bestuderen. Dit kan niet in de weefselspecifieke mutant, omdat daar slechts een klein deel van de cellen gemuteerd zijn. De weefselspecifieke mutant wordt gemaakt om naar tumorvorming en metastasering te kijken. Daarbij willen we de humane situatie in patiënten met een feochromocytoom zoveel mogelijk nabootsen en de weefselspecifieke mutant lijkt het meest op de patiënt. Het is daarnaast zeer aannemelijk dat de algehele mutant niet lang genoeg leeft om tumorgroei en metastase te kunnen bestuderen. Bovendien zou het kunnen dat in de algehele mutant ook tumoren in andere weefsels ontstaan, aangezien het bekend is dat mutaties in Cluster 1 genen ook kunnen leiden tot het ontstaan van tumoren in andere organen, zoals de nier. Deze uitleg is ook verwerkt in de tekst van de aanvraag.
- 3.4 De formulering omtrent de 'interrenal gland' is aangepast.

Description of Animal Procedures:

- DAP1 (DAP2 na gevraagde aanpassing)
 - *2. A. De power die gehanteerd zal worden is veranderd in 0,8.
 - *2.B. Er is nu verwezen naar de uitleg die in het projectvoorstel staat.
 - *2. B. Zebravissen hebben lang geleden een genoomduplicatie ondergaan. Daardoor kan het zijn dat zebravissen twee homologe genen hebben van een humaan gen. Toegelichte berekeningen waaruit het totaal aantal dieren komt zijn nu toegevoegd.
 - *2. H. Ik, noch de zeer ervaren dierverzorger, noch collega-onderzoekers die met zebravissen werken kennen middelen die gebruikt worden voor continue pijnbestrijding bij zebravissen. Ook is het zo dat de kans dat de vissen pijn ervaren als gevolg van de tumor zeer klein is, aangezien patiënten met een feochromocytoom dit ook niet hebben.
- DAP3.
 - *1.3 Klopt, dit is nu veranderd.
 - *2.A.1. Klopt, dit is nu veranderd.
 - *2.A.2 De bijnier is te klein om de benodigde hoeveelheid cellen in te injecteren. De aanvraag is aangepast en bevat nu subcutane injectie in plaats van injectie onder het nierkapsel.
 - *2.A.3. Er zijn geen eerdere graft experimenten uitgevoerd met de voorgestelde cellen. Aangezien er dus geen data zijn waaruit we de verwachte standaard deviatie kunnen

afleiden, nemen we 12 dieren per groep. Er is namelijk aangetoond dat dit aantal dieren per groep een goede kans geeft op een significant resultaat, zie referentie in de aanvraag. Dit aantal geldt alleen voor de uiteindelijke proef waar tumorgroei en metastase wordt bestudeerd.

Deze toelichting is ook in de aanvraag verwerkt.

*2.D Uit uw opmerking blijkt niet wat er precies mist. Dit onderdeel is nu wat uitgebreid in de aanvraag en voldoet nu hopelijk aan uw verwachtingen.

*2.J De tumorgrootte is verwijderd uit het onderdeel humane eindpunten.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 15-09-2015

- Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-3.2 De onderzoekers poneren dat er geen in vivo model is beschreven voor dit type kanker. De commissie heeft een review artikel gevonden over dit onderwerp: From Nf1 to Sdhb knockout: successes and failures in the quest for animal models of pheochromocytoma (C. Lepoutre-Lussey et al, Molecular and Cellular Endocrinology (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.06.027>) en meent dat het door de onderzoekers geponeerde in het licht van de inhoud van dit review geen stand houdt. Zij verzoekt de onderzoekers de informatie uit dit review op te nemen in de aanvraag en de aanvraag zo nodig aan te passen.

-Het antwoord op de gestelde vraag over 3.4 is niet afdoende om de huidige proefopzet te verantwoorden. Wanneer er in proef 2 geen tumoren ontstaan, is er geen reden meer om proef 1 uit te voeren. Het doel is immers het genereren van een tumormodel. De onderzoekers worden nogmaals verzocht de volgorde van dierexperimenten om te draaien en een go/no go moment op te nemen in de aanvraag. Indien zij anderszins van mening zijn worden zij verzocht dit duidelijk en overtuigend te beargumenteren.

Description of Animal Procedures:

-DAP3

*2.A.3 De keuze voor 12 muizen per groep wordt niet ondersteund door de gegeven referentie. In dit artikel komt een groeps grootte van 12 niet voor. De berekeningen voor de benodigde groeps grootte zijn in dit artikel ook gestoeld op een bepaalde effectgrootte die men wil aantonen. De onderzoekers worden verzocht opnieuw te beargumenteren waarom zij deze groeps grootte willen hanteren.

*2.D In de toelichting van de CCD staat uitgelegd wat met verfijning wordt bedoeld (onder D op pagina 13): het beoogde doel van de proef kan niet worden bereikt met een andere opzet (design) waardoor de dieren minder ongerief ondervinden. De onderzoekers worden verzocht deze vraag opnieuw te beantwoorden.

- Datum antwoord: 22-09-2015

- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-3.2 De betreffende tekst is aangepast en genuanceerd. De referentie is opgenomen in de tekst. Ook in de referentie staat dat er tot op heden geen goed diermodel is voor Cluster 1 feochromocytoma.

-Het doel van dit onderzoeksproject is om diermodellen te genereren voor feochromocytoma. Mocht dit lukken dan zullen ze worden gebruikt om een beter begrip van de moleculaire mechanismen te krijgen die leiden tot tumorvorming en om de mogelijkheid te krijgen in een diermodel te kunnen screenen voor blokkers van deze pathways. Zoals beschreven is het nog nooit gelukt hiervoor een goed diermodel op te zetten. Wij denken dat dit samenhangt met de moleculaire pathways die geactiveerd worden met een █████ mutatie en dat daarmee zebrafissen het ideale diermodel kan zijn, maar bij gebrek aan goed inzicht in de onderliggende mechanismes en gezien de eerdere pogingen door andere groepen met andere modellen is het project risicovol. Om deze reden omvat ons voorstel 2 proeven (proef 1 en 2) die een verschillend risicoprofiel en bruikbaarheid zullen hebben. Bij Proef 1 zullen alle cellen een mutatie hebben in █████. Technisch gezien zal deze opzet zeker slagen (laag risico) en de verwachting is dat een deel van de moleculaire pathway die zal leiden tot feochromocytoma's uit deze vissen te herleiden is. Het is echter te verwachten dat de vissen te kort leven om tumoren te ontwikkelen. Wel verwachten wij grootschalige medicijn testen uit te kunnen voeren bij de larvale stadia van deze mutanten. Dit kan leiden tot het identificeren van potentiële medicijnen tegen feochromocytoma. Bij proef 2 proberen we het █████gen alleen in de bijnier uit te schakelen. Hoewel dit het ideale modelsysteem zou zijn heeft dit model een aantal nadelen. Allereerst is het risico dat deze opzet niet zal slagen beduidend groter dan van proef 1. Immers, we weten niet of de grootte en keuze van de promotor die voor weefselspecifieke deletie van █████ moet zorgen goed genoeg is. Daarnaast weten we niet of de vissen dan tumoren zullen gaan ontwikkelen. Ten derde is de bijnier van de vis zo klein dat we daar minder analyses aan kunnen doen dan aan de hele vis zoals gegenereerd in proef 1. Algehele mutanten kunnen dus op zichzelf waardevolle bijdragen leveren aan het onderzoeksveld.

Description of Animal Procedures:

-DAP3

*2.A.3 De referentie is aangepast. Excuses voor de verwarring.

*2.D Deze informatie is nu verwerkt in de aanvraag.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 12-10-2015

- Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-De doelstelling van het project is het genereren van een tumormodel. Tot welk model leidt proef 1 en wat is de waarde van dit model? Indien in proef 1 geen tumormodel in strikte zin wordt gegenereerd, kunnen de onderzoekers de doelstelling dan anders verwoorden waardoor zowel proef 1 als proef 2 binnen deze nieuwe doelstelling passen? Een goede omschrijving van het doel van het project is noodzakelijk voor de ethische afweging en de toetsbaarheid van het project. De onderzoekers worden verzocht deze vraag met zorg te beantwoorden.

Description of Animal Procedures:

-DAP3, vraag D. De gegeven referentie toont aan dat in zijn algemeenheid voor een pilotstudy een groepsgrootte van 12 verdedigbaar is, maar dit geldt niet zonder meer voor dit experiment. Als aanname voor de globale berekening van het benodigde aantal dieren gaat de commissie desalniettemin akkoord met deze groepsgrootte. Zij gaat er vanuit dat u in het werkprotocol een goed onderbouwde groepsgrootte zult hanteren.

- Datum antwoord: 16-10-2015
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-Het diermodel dat gegenereerd wordt in proef 1 is een diermodel waarbij in alle cellen een mutatie aanwezig is. Naar verwachting zal dit diermodel waardevolle inzichten geven in de basale mechanismes die een rol spelen bij het ontstaan van feochromocytomen. Dit diermodel is inderdaad geen tumormodel in strikte zin, daarom is de projectomschrijving nu op meerdere plekken breder opgezet. Ook de titel van het project is aangepast.

Description of Animal Procedures:

-DAP3, vraag D. Ik neem uw overweging mee en zal in het werkprotocol een goed onderbouwde groepsgrootte hanteren.

- 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 generate animal models to gain insight in the molecular mechanisms behind the emergence and development of Cluster 1 pheochromocytoma'. De onderzoeker streeft er naar goed omschreven diermodellen voor feochromocytoom te verkrijgen. Het is aannemelijk dat deze diermodellen meer inzicht zullen verschaffen in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het ziektebeeld en in de progressie van de ziekte, en aanknopingspunten voor een therapie zullen opleveren. Feochromocytoom komt niet vaak voor in de populatie, maar is wel een ernstige ziekte met een

slechte prognose. Wanneer de tumor niet operatief verwijderd kan worden, is er geen verdere behandeling van deze letale ziekte mogelijk. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een therapie voor feochromocytoom, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor mensen met deze aandoening. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De groep heeft samenwerkingspartners gevonden die op alle onderscheiden aspecten relevante ervaring inbrengen in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot goed omschreven diermodellen voor feochromocytoom.
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 homozygote genetische aanleg voor feochromocytoom in de zebravissen en de groei van tumorcellen in de muizen. De DEC schat het ongerief voor de zebravissen als gevolg van de benodigde video-observatie, herhaalde individuele huisvesting gedurende 24 uur, en bloedafname onder terminale anesthesie in als licht; het ongerief voor de zebravissen als gevolg van de homozygote genetische aanleg voor feochromocytoom (hetzij in het hele dier, hetzij weefselspecifiek) schat de commissie in als matig. De DEC schat het ongerief voor de muizen als gevolg van de benodigde subcutane injectie van tumorcellen tijdens anesthesie en de herhaalde imaging tijdens anesthesie in als licht; het ongerief als gevolg van de subcutaan groeiende tumoren totdat zij metastaseren schat de commissie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de zebravissen en de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 53% van de vissen, matig voor 47% van de vissen, en matig voor alle muizen.
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. Transplantatie van humane tumorcellen is niet mogelijk in minder complexe diersoorten dan muizen.
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 het gebruik van imaging om tumorgroei en metastasering te volgen kunnen meerdere metingen aan één dier gedaan worden, wat tot betrouwbaardere resultaten leidt en minder dieren vergt. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 19.500 vissen en 90 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. De te gebruiken zebravislarven worden dagelijks gescoord op letaliteit van de aangebrachte mutatie. De commissie heeft besproken of dit een aanvaardbare methode is, en of er geen andere uitleesparameters mogelijk zijn dan het doodgaan van de larven. Ook heeft de commissie een discussie gevoerd over de vraag of er in dit opzicht een verschil gemaakt zou

mogen worden tussen zebravislarven en bijvoorbeeld muizenpups. Is het hanteren van dit soort uitleesparameters ethisch minder problematisch als het zebravislarven betreft? De commissie concludeert dat het geven van een antwoord op die vraag meer tijd en inspanning zou vergen dan deze procedure toelaat. Ze gaat uiteindelijk akkoord met de beschreven methode, vanwege het ontbreken van reële alternatieven. De tumorcellen worden subcutaan getransplanteerd bij de muizen, waardoor tumorgroei en metastasering is te volgen met bioluminescente imaging. Doordat metastasering al in een vroeg stadium kan worden vastgesteld wordt het ongerief voor de dieren zo veel mogelijk beperkt. 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 moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van feochromocytoom. Tevens worden goede tumormodellen voor feochromocytoom Cluster I ontwikkeld, waarmee in de toekomst de effectiviteit van nieuwe therapeutische strategieën getest kan worden. Het belang van meer inzicht in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van feochromocytoom en het beschikbaar komen van goede tumormodellen acht de DEC substantieel, gezien de slechte prognose van deze zeldzame ziekte.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle muizen en 47% van de vissen matig ongerief en 53% van de vissen licht ongerief zullen ondervinden als gevolg van de erfelijke aanleg voor de ziekte of de onderhuidse transplantatie van tumorcellen 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.

Radboud universitair medisch centrum
 Concernstaf, sectie Kwaliteit en Veiligheid

████████████████████
 Postbus 9101, ██████████
 6500 HB Nijmegen

████████████████████
 Postbus 9101, ██████████
 6500 HB Nijmegen

████████████████████
 KvK 41055629/4

Datum ██████████
 2 november 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 ██████ als gemachtigde van de vergunninghouder. Hiervoor AUB het bij u bekend e-mailadres ██ en **bovenstaand postadres** ████████████████████ Postbus 9101, ██████████, 6500 HB Nijmegen) gebruiken.

Om verwerking door de financiële afdeling mogelijk te maken verzoeken wij *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: 2015-0098
Verantwoordelijk onderzoeker: ██████████

Bij voorbaat dank.

Met vriendelijke groeten

██
 ██
 ██



> 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
AVD103002015301

Bijlagen

2

Datum 5 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015301. 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: Professor
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

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
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: 1 december 2015
Geplande einddatum: 30 november 2020
Titel project: Towards treatment for pheochromocytoma
Titel niet-technische samenvatting: Op naar een behandeling voor bijniertkanker
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: 2 november 2015



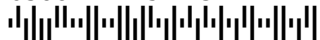
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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
AVD103002015301

Bijlagen

2

Datum 5 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 5 november 2015

Vervaldatum: 5 december 2015

Factuurnummer: 15700301

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015301	€ 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
AVD103002015301

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum **03 DEC. 2015**

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Geachte

Op 2 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Towards treatment for pheochromocytoma" met aanvraagnummer AVD103002015301. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op verzoek van de CCD heeft u de Niet technische Samenvatting aangepast. Deze hebben wij op 30 november 2015 ontvangen.

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 gestelde voorwaarden zijn algemene voorwaarden die worden gesteld bij meerjarige projecten zodat wordt voldaan aan hetgeen voortvloeit uit artikel 10 van de wet. U kunt met uw project "Towards treatment for pheochromocytoma" starten. De vergunning wordt afgegeven van 4 december 2015 tot en met 30 november 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 2 november 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, met als toevoeging de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen met instemming van de IvD.

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 gegevens 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.

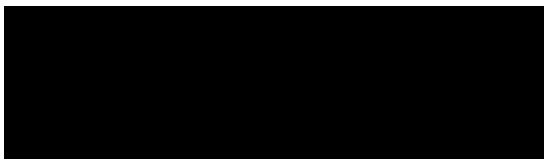
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

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,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv 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: Postbus9101
Postcode en woonplaats: 6500 HB Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 4 december 2015 tot en met 30 november 2020, voor het project "Towards treatment for pheochromocytoma" met aanvraagnummer AVD103002015301, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Professor. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 november 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 2 november 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 30 november 2015;
 - c. Advies van Dierexperimenten commissie dd 2 november 2015, ontvangen op 2 november 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Analyzing the zebrafish phenotype of homozygous whole animal mutants	Zebravissen (Danio rerio) de dieren worden genetisch gemodificeerd	17600	Matig / Moderate
Examining the interrenal phenotype of the tissuespecific mutants	Zebravissen (Danio rerio) de dieren worden genetisch gemodificeerd	1900	Matig / Moderate
Transplanting cells in mice	Muizen (Mus musculus) / NOD/SCID, C57BL/6	90	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 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 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

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

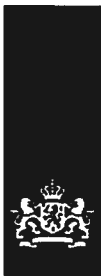
Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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.

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
	NTS2015302								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x			x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Factuurinformatie				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Mail verzoek aanvullende informatie 11-11-2015				x		x	x	
9	Verzoek aanvullende informatie				x		x	x	
10	Mail verzoek aanvullende informatie DEC 12-11-'15				x		x	x	
11	Reactie aanvullende informatie				x		x	x	
12	Mail reactie aanvulling DEC 13-11-2015				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Mail beschikking en vergunning 16-12-2015				x		x	x	
16	Mail terugkoppeling DEC 17-12-2015				x		x	x	

04 NOV. 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 / 302.
 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, t.a.v. [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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input 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	[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 0 1 . 1 2 . 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 . 1 2 . 2 0 1 7
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's disease
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar het effect van genetische veranderingen in ratten op de ontwikkeling van Huntington's disease
- 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 02 - 11 - 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.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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's 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 or 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.

Huntington's disease (HD) is a devastating inherited neurodegenerative disease characterized by progressive motor, cognitive, and psychiatric symptoms without any cure to slow down or stop the progress of the disease. It is therefore crucial to identify the arise of each class of symptoms ('phenotypes') before the onset of the full-blown disorder and how they predict the motor deficit, because early symptoms may be targeted by early interventions slowing down the disease process. Hence, our research question is: which classes of symptoms develop sequentially over time preceding the manifestation of HD in a translational rat model?

Summary

Neuropsychiatric and neurological disorders constitute a major health problem in Europe, and their impact on public health and society is increasing with the aging of the population. According to the Strategic Research Agenda of the European Platform on Innovative Medicines (IMI) (<http://www.imieurope.org>) one of the most important bottlenecks for finding more effective drugs for brain disorders is the development of model systems that translate to human pathology and are predictive of clinical efficacy. To address this bottleneck, new transgenic rat models for these disorders require phenotyping.

Behavioural phenotyping of rats provides an advantage over mice given their elaborative behavioural repertoire. More specifically, rat models have made substantial contributions to our understanding of biological function and behavior. Large numbers of rat disease models exist and have successfully proven their utility for modeling the human condition (von Hörsten et al., 2003; Abbott, 2004). Although behaviour can be studied with some restrictions in mice, the current scientific knowledge concerning the complexity of learning and memory, as well as the multiplicity of brain systems supporting it, come from behavioural research using rats (Report of the NIH Rat Model Priority Meeting, 1999). Comparative analyses of movements in rats and primates show homology of many motor patterns across species. Advances have been made in identifying rat equivalents of akinesia, tremor, postural deficits and dyskinesia, which are relevant to neurological disorders (Cenci et al. 2002). Other practical advantages of rats include their larger size, which facilitates direct invasive procedures, such as blood and cerebrospinal fluid collections, repetitive physiological measurements and surgical manipulations [which could be scope of follow-up studies].

Whereas understanding disorder symptoms is important, even more important is the understanding of phenotypes that precede the full-blown disorder symptoms and their stability during the course of the disorder, so that possible therapies can be more effective in preventing

further development of these disorders. This insight is mostly lacking in clinical studies, because prospective longitudinal studies are very time consuming and costly. The relatively short life span of experimental rodents allows us to overcome this limitation of clinical (human) studies. One particularly relevant neurological disorder in the framework of the foregoing concerns Huntington disease (HD). HD is an autosomal dominantly inherited neurodegenerative disease with a prevalence of 6 per 100,000 in Europe and North America (Pringsheim et al. 2012). Development of HD is dependent on a single mutation that results in the extension of the CAG repeat sequence present in the gene for the Huntingtin protein (The Huntington's disease collaborative research group, 1993). Huntington's Disease symptoms (more details below) comprise adult-onset personality changes, generalized motor dysfunctions, and cognitive decline (Zuccato et al. 2010). The peak age of adult-onset HD is between 35 and 50 years. Huntington's disease progresses over 15-20 years. Characteristic symptoms reflect a triad of motor, cognitive, and psychiatric manifestations of the disease. The onset of disease is currently defined as the point at which characteristic motor signs develop; this is when a patient moves from being a "premanifest gene carrier" to having "manifest" disease (Novak et al. 2010). On the other hand, HD patients can develop cognitive or psychiatric symptoms (or both) during the prodromal ("premanifest") period, often many years before any motor signs are seen (Tabrizi et al. 2009, Paulsen et al. 2008). **Due to the importance of the identification of the arise of each class of symptoms, the goal of this project will be the detailed investigation of the phenotypes preceding the onset of HD, modeled by the BACHD transgenic rat model.**

Huntington's Disease

Huntington's disease (HD) is a dominantly inherited neurodegenerative disorder that is caused by an unstable expansion of a CAG repeat within the coding region of the IT-15 gene (HD Collaborative Research Group, 1993). It is an adult-onset, chronic and progressive neurodegenerative disease and clinically characterized by abnormal choreic involuntary movements and by psychiatric, psychological and intellectual disorders, and radiologically characterized by striatal atrophy of variable degree. The worldwide prevalence of HD is 5–10 cases per 100.000 persons but varies greatly geographically as a result of ethnicity, local migration and past immigration patterns. HD is an hereditary, progressive, degenerative and often fatal neurodegenerative disorder and there is no cure and strategies available to prevent or reduce the incidence of this disorder. In the early stages, HD is classically associated with progressive emotional, psychiatric, and cognitive disturbances (Bates et al. 2002). Commonly reported symptoms in HD include progressive weight loss, alterations in sexual behavior, and disturbances in the wake-sleep cycle that occur very early in the course of the disease and may partly be explained by hypothalamic dysfunction (Politis et al. 2008). In the later stages, HD is characterized by motor signs, progressive dementia, or gradual impairment of the mental processes involved in comprehension, reasoning, judgment, and memory (Bates et al. 2002, Rosenblatt et al. 2007). Due to increasingly severe dementia and progressive motor dysfunction, patients with advanced HD may become unable to walk, have poor dietary intake, eventually cease to talk, and become unable to care for themselves, therefore potentially requiring long-term institutional care. Life-threatening complications may result from injuries related to serious falls, poor nutrition, infection, choking, and inflammation. Most HD patients eventually succumb due to aspiration pneumonia because of swallowing difficulties (Bates et al. 2002). The majority of therapeutics currently used in HD are designed to ameliorate the primary symptomatology of the HD condition itself (psychiatric agents for the control of behavioral symptoms, motor sedatives, cognitive enhancers, and neuroprotective agents) and thus to improve the quality of life of the patients. Since HD is a progressive and degenerative disorder we aim at identifying the phenotypes preceding the onset of HD, and investigating their stability during the course of the disease.

The urgency of a good rodent model of Huntington's Disease

Since the discovery of the HTT mutation 20 years ago, close to 10,000 papers have been published on HD, approximately half of which relate to attempts to model various aspects of the disease. The organisms used for this endeavour have included worms (*Caenorhabditis elegans*), fruitflies (*Drosophila melangaster*), mice, rats, sheep and, more recently, pigs and monkeys. The findings from animal model studies have helped to elucidate important pathways that are disrupted in HD and have provided important insights into the pathogenesis of this disease. These developments have

been accompanied by the identification of several therapeutic candidates and novel approaches to therapy (Ross and Tabrizi 2011). Indeed, over 15 clinical trials have been conducted in patients with HD since the discovery of the HTT mutation (Walker 2007, Mestre et al. 2009). Despite the considerable progress in our understanding of the disease, an effective treatment that either prevents or slows the pace of HD remains out of reach. The slow rate of progression of HD often necessitates lengthy and therefore costly clinical trials. In addition, the number of patients with HD that are available to participate in such trials is limited, which means that a relatively small number of compounds can be tested at any one time. Thus, animal models will continue to have a role not only as a filter for test compounds before the initiation of human clinical trials but also as a means for identifying candidate compounds with therapeutic promise. The translational potential of an animal model of disease may be gauged on the basis of its construct, face and predictive validity (Puoladi et al 2013). Rodent models of HD are versatile, not least because there are established batteries of tests available for them that allow assessment of motor, cognitive and psychiatric-like features of the disease. The high level of conservation of genes between rodents and humans makes interrogation of specific molecular targets more feasible than it is in other animal models. Moreover, the availability of a vast collection of tools for rodent studies allows the investigation of several behavior domains using different well-established paradigms. Thus, the purpose of this project is the detection of the first core symptoms of HD and the monitoring of its development by assessing different aspects of the clinical phenotype of this transgenic rat model.

The BACHD rat model

The [REDACTED] has recently generated a new transgenic rat model of HD, the BACHD rat. This rat model is of particular interest since it expresses the full length human mutant huntingtin (fl-mhtt) with 97 CAG-CAA mix repeats under control of the human HD promoter gene (Yu-Taeger et al. 2012). BACs (Bacterial Artificial Chromosomes), containing human genomic DNA spanning the full-length HTT gene with 97 CAG/CAA repeats and including all regulatory elements (Gray et al, 2008), were microinjected into oocytes of Sprague Dawley rats. The BACHD rat model is particularly relevant since it presents motor impairments and neuropathological phenotypes reminiscent of symptoms seen among HD patients (Yu-Taeger et al. 2012, Abada et al. 2013a, Abada et al. 2013b). The life span of the BACHD rat model (18 months) allows the investigation and the assessment of the symptoms preceding the full-blown disease. Therefore, we will be able to define precise time windows for future interventions.

Validity of the current transgenic model

In principle, the relevance of a given animal model of human disease is often judged on the basis of three broad measures of validity: the animal model's construct validity, face validity and predictive validity.

Construct validity: pertains to how closely the animal model reproduces the pathogenic lesion that underlies the disease in humans. For genetic diseases such Huntington's Disease, a model with high construct validity would reproduce the human mutation in the context of the full-length human gene under the control of the gene's endogenous promoter. In the context of Huntington's disease (HD), the construct validity of models expressing full-length human mutant huntingtin (HTT) (the genomic sequence or cDNA) is greater than those expressing full-length mouse mutant Htt (Puoladi et al. 2013). Furthermore, models in which mutant HTT or a fragment thereof is under the control of the HTT promoter show greater construct validity than models in which the same coding sequence is under the control of a non-HTT promoter. This is precisely the case of the BACHD rat model which contains human genomic DNA spanning the full-length HTT gene with 97 CAG/CAA repeats, under the control of the HTT human promoter and including all regulatory elements (Yu-Taeger et al. 2012)

Face validity: relates to the extent to which the animal model reproduces the symptoms and phenotypes associated with the human disease. For HD, animals with high face validity would reproduce progressive motor and cognitive deficits as well as psychiatric-like disturbances (Puoladi et al. 2013). Previous studies have shown that BACHD rats present motor and cognitive impairments reminiscent of symptoms seen among HD patients (Yu-Taeger et al. 2012, Abada et al. 2013a, Abada et al. 2013b). Moreover, neuroanatomically and histologically, the models would display selective, age-dependent striatal and cortical neuronal loss and atrophy, nuclear inclusions and neuropile aggregates (Puoladi et al. 2013). Neuropathologically, the distribution of neuropil aggregates and nuclear accumulation of N-terminal mutant huntingtin in BACHD rats is similar to the

observations in human HD brains (Yu-Taeger et al. 2012). Aggregates occur more frequently in the cortex than in the striatum and neuropil aggregates appear earlier than mutant htt accumulation in the nucleus. Furthermore, an imbalance in the striatal striosome and matrix compartments has been detected in early stages of the disease. In addition, reduced dopamine receptor binding was detectable by in vivo imaging. Predictive validity: it is judged based on how closely improvements in response to treatment in the animal model parallel, or predict, improvements in patients. For treatable conditions, the predictive validity of an animal model may be tested, but for diseases such as HD that are without an effective treatment, assessment of the predictive validity of an animal model is currently impossible (Puoladi et al. 2013).

As mentioned before, previous studies have shown that BACHD rats present motor impairments and neuropathological phenotypes reminiscent of symptoms seen among HD patients (Yu-Taeger et al. 2012, Abada et al. 2013a, Abada et al. 2013b)

Furthermore, previous unpublished data from our [REDACTED] have been shown that BACHD rats present severe HD-like phenotypes starting from the age of 18 months. These findings derive from blood test results that provide evidence of mitochondrial dysfunction (Eckmann et al. 2014) and the onset of neurodegeneration. Due to the high incidence of tumors and consequent mortality of both WT and BACHD rats, however, few studies have been conducted in animals at this advanced age. Previous experiments have been already performed in this transgenic rat model, but they are lacking of information about phenotypes preceding the onset of severe symptoms in BACHD rats. Additionally, the studies performed so far did not cover several behavioural domains (social behavior, sensori-motor function) but were mainly focused on coordination, gait and cognition (Yu-Taeger et al. 2012, Abada et al. 2013a, Abada et al. 2013b). The investigation of the previously mentioned domains is necessary for the early detection of the first core symptoms of the disease and the monitoring of its development so that possible therapies can be more effective in preventing further development of neurodegeneration. Thus, the core of this project will be the detailed investigation of the phenotypes preceding the onset of HD, modeled by the BACHD rat model. In order to do that we will combine classical behavioural paradigms with novel automated and sophisticated methods (namely the Phenotypers) which allow high-throughput testing.

Content of the project and funding: The content of this project has been approved and funded by [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 phenotype this rat model for Huntington's Disease in order to define behavioural features that precede the manifestation of the full-blown disorder symptoms. We anticipate that this will provide a fundament for understanding disorder progress and the design of timely interventions.

Rats will be characterized across behavioural domains (at specific developmental time windows):

- **Social behaviour**


- Emotion (anxiety and depression)
- (Sensory-) Motor function

Our lab is experienced in the investigation of the previously mentioned domains in rats, and in addition, also in the use of methods to obtain molecular markers and interpret and correlate the data to the behavioural parameters; thus, molecular measurements are also included in this project to optimize the translational value of the results. Moreover, novel automated paradigms and analysis methods for rats will be developed and validated, which also is part of our expertise by means of close cooperation with manufacturers and participation in EU-funded projects. Our experience with behavioural and molecular measurements in rats, together with the availability of the required equipment and the expertise of how to apply these provides high feasibility of this project.

3.3 Relevance

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

The World Health Organization estimated in 2006 that neurological disorders and their direct consequences affect as many as one billion people worldwide. Neurological disorders included in the neuropsychiatric category contribute to 2% of the global burden of disease, while cerebrovascular disease and some of the neuroinfections (poliomyelitis, tetanus, meningitis and Japanese encephalitis) contribute to 4.3% of the global burden of disease in 2005. Thus neurological disorders constitute 6.3% of the global burden of disease. Furthermore, neurological disorders are an important cause of mortality and constitute 12% of total deaths globally. In particular, Huntington's Disease (HD) is a progressive, degenerative, genetic disease. The worldwide prevalence of HD is 5–10 cases per 100.000 persons but varies greatly geographically as a result of ethnicity, local migration and past immigration patterns. HD symptoms comprise adult-onset personality changes, generalized motor dysfunctions, and cognitive decline. The peak age of adult-onset HD is between 35 and 50 years. A small percentage of patients (10%) develop symptoms before age 20. Increased focus on research strategies, prevention, and care is therefore necessary to reduce the burden associated with HD. Animal models of neurological disorders are essential for the assessment of new therapeutic options. Here we focus on Huntington's Disease because of the associated burden for the patient and society, and our research track record and funding.



3.4 Research Strategy

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

This project is aimed to phenotype an existing transgenic rat models for Huntington Disease. The overarching aim is to elucidate the phenotypes that precede the full-blown manifestation of the disorder and their stability during the course of the disorder. We aim to extend previous findings with earlier and later time points of measurement with age-adjusted tests and we aim to use more sophisticated behavioural methods to assess

phenotypes preceding and during manifestation of the full-blown disorder symptoms. Regarding the sophisticated behavioural methods we will implement the Phenotyper, a homecage-like observation cage for rats that is completely optimized for video tracking and can be customized with additional automated tools to subject the animals to behavioural tests and training.

We will phenotype rats across behavioural domains at specific developmental time windows, as specified below:

- Social behaviour
- Emotion (anxiety and depression)
- (Sensory-) Motor function

Additionally, in order to reveal the brain correlates of the behavioural phenotypes identified in the behavioural tests rats will be killed, either by decapitation or perfusion. Decapitation will be applied when fresh brain material is needed, e.g. for the assessment of protein or mRNA levels, or for neurochemical assessments. Perfusion will be applied when fixed brain material is needed, for immunohistochemistry.

In the 17 years since the discovery of the HD gene, a large number of basic research studies has highlighted that multiple molecular and biochemical pathways ultimately lead to a complex disease phenotype. Today, the current status of HD research looks promising. The development of strategies to counteract HD at its primary source, including RNAi and intrabodies, is now well underway. Multiple downstream pathways and molecules are emerging as suitable therapeutic targets (Zuccato et al. 2010) Modulating the cellular stress response, correcting the BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) deficiency associated with HD, and targeting specific proteins are some of the many encouraging candidate pathways that may yield effective treatments. Furthermore, systematic, unbiased approaches to identify HD modifiers promise to further enrich the opportunities for therapeutic intervention. Despite significant achievements in the understanding of the pathogenesis of HD, more efforts are needed to clearly identify the abnormalities/pathways/targets that are most critical for neurodegeneration and to distinguish them from the ones that are secondary responses or simply related epiphenomena. Those abnormalities associated with normal huntingtin function and possibly influenced by the CAG expansion seem to have greater appeal. Some of the activities altered by the mutation might specifically occur in adulthood and in acute phases of the disease or be already present at young ages, leading to subtle phenotypes. Overall, this classification is important to discriminate key targets specific to HD from those for more generic neurodegeneration, and to exclude the nonessential ones. Revealing disease trigger processes will provide potential routes to HD-specific therapeutics and allow prioritizing the growing portfolio of therapeutic candidates. The identification of the timing of appearance of the different dysfunctions (early and late events) and of the mechanisms that explain the selective neuronal vulnerability, in combination with more precise guidelines to translate the results of animal studies into the clinic will provide new hopes for a cure. In addition, new biomarkers to follow HD progression and markers to monitor drugs' engagement in a given molecular mechanism will hopefully constitute new tools for moving faster into the clinic.

Therefore, within this project the BACHD rat model will be behaviorally characterized using a unique integrated system based on video tracking and operant testing in a home cage situation. In addition, innovative behavioural paradigms will be developed to test for the social and emotional impairments (social interaction and anxiety) typically seen in HD (Zuehlke et al., 2007; Vaccarino et al., 2011). These findings will be extended with the assessment of (sensory-)motor function. Overall, this will enable the detection of early onset of specific symptoms and provide read-out parameters for future pre-clinical studies applying novel substances for the treatment of HD.

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 phenotype rats across behavioural domains at specific developmental time windows, as specified below:

- Social behaviour: Social Interaction and ultrasonic vocalizations in the Phenotyper: P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).
- Emotion (anxiety and depression): elevated plus maze, light/dark box test, Phenotyper: Light Spot Test, Discriminative Avoidance Task (DAT): P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).
- (Sensori-) Motor function: Holding bar, grip strength test, static rod, Phenotyper: Home cage screening & circadian rhythm: P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

The rats are divided into 2 groups (wild type and transgenic animals) but for the experimental purposes they are going to be divided into three batches. Each of these 3 batches will be subjected to different tests as described below. Overall, all animals follow the schedule below:

· Group A : wild type rats.

· Group B : BACHD transgenic rats.

· **Batch 1:** It consists of 24 control (12 male and 12 female) animals and 24 transgenic (12 male and 12 female). This batch is going to be:

o Individually tested for anxiety and depression using the following paradigms and at the following ages: elevated plus maze, light/dark box test, Phenotyper: Light Spot Test, Discriminative Avoidance Task (DAT): P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

· **Batch 2:** It consists of 48 control (24 male and 24 female) animals and 48 transgenic (24 male and 24 female). This batch is going to be:

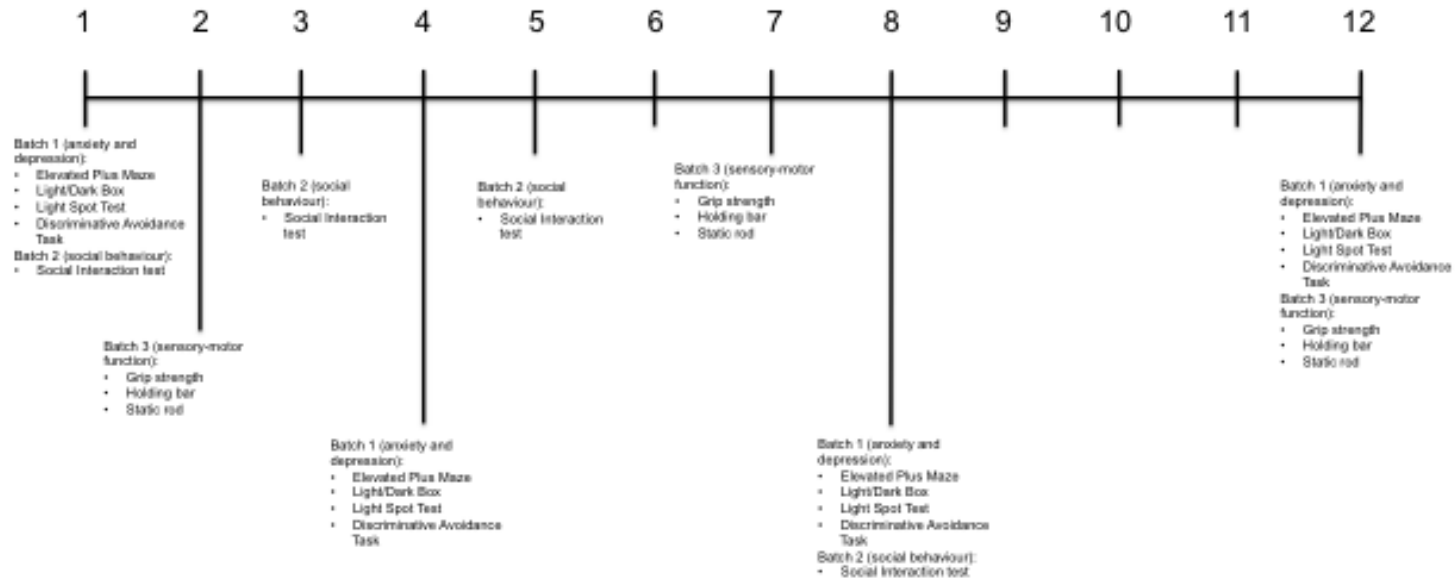
o Tested in group of two rats for social behaviour using the following paradigms and at the following ages: social Interaction test and ultrasonic vocalizations in the Phenotyper: P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

· **Batch 3:** It consists of 24 control (12 male and 12 female) animals and 24 transgenic (12 male and 12 female). This batch is going to be:

o Individually tested for (Sensori-) Motor function using the following paradigms and at the following ages: holding bar, grip strength test, static rod, Phenotyper: Home cage screening & circadian rhythm: P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

We will employ longitudinal testing, followed at the end by decapitation/perfusion approaches; as specified above, a separate batch of animals will be used for each behavioural domain.

months of age



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

This project aims to phenotype a transgenic rat model for Huntington's Disease across developmental time windows in order to assess phenotypes preceding and during the full-blown manifestation of disorder symptoms.

We use 'standard' tests, automated behavioural systems such as the PhenoTyper to assess behaviour across domains (social behaviour (automated systems); emotion (standard tests + automated systems), motor coordination (standard tests and automated systems)). Tests are adjusted to the capabilities of the rats at each developmental time window. Additionally, we will assess the brain correlates of the behavioural phenotypes by post-mortem analyses.

We are therefore prioritizing the completeness of a longitudinal study rather than the investigation of the molecular markers at different ages, which could be part of future projects. We aim at detecting interesting and useful phenotypic traits, which might be age- and/or genotype-specific and only clearly identified by an integrated and comprehensive analysis. That's the reason why we are going to combine classical and automated paradigms. The behavioral quality of our study will be mostly possible thanks to the home-cage nature of the automated testing, which virtually introduces no artifacts induced by handling and novelty-related stress. Clearly, only longitudinal individualized screening provides the highest likeliness to reliably characterize a certain model of disease (Crawley and Paylor 1997) such Huntington's Disease. As a matter of fact, the general requirement of repeated testing is more easily achieved with a higher level of standardization, by using automated technology.

Thus, these combined experimental approaches will provide the opportunity to investigate and validate new interventions and therapies in the future. There are no go/no go points, since measurements are not dependent on each other; the absence of a phenotype at a certain developmental stage does not mean that the phenotype will be absent. A specific phenotype not present at early time point can be caught up later in development.

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	Breeding and Behavioural phenotyping and molecular correlates

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Breeding and Behavioural phenotyping and molecular correlates

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.

BACHD transgenic rats (heterozygous) and wild type (WT) littermates will be bred on a Sprague Dawley background and then used for the experiments described below. The genetically altered animals are expected to have a likely harmful phenotype so the breeding will be considered with discomfort. After weaning, WT and transgenic animals will be divided in three batches, and each batch will be tested as described below. We will then phenotype rats across behavioural domains at specific developmental time windows, as specified below. The primary outcome parameters as defined below fit within the behavioural domains as specified in the project proposal. Thus, the parameters have been chosen such that provide indices of changes in social behaviour, emotion and (sensori)-motor function. Huntington's Disease patients show symptoms that can be translated in changes in these behavioural domains that can be studied in rodent models. Besides generating validation-data by 'standard' tests, experiments are designed using automated behavioural testing equipment such as the PhenoTyper. This is done to be able to correlate the variables and develop an automated screening assay to monitor the onset and development of HD. In the PhenoTyper, behaviour is measured automatically, and thus objectively and tirelessly, observed generating a wide range of parameters per individual animal and, in the case of the social interaction study, for each couple of animals. By monitoring the spontaneous (i.e.undisturbed) behaviour, we aim to detect early onset of symptoms and subtle changes in this rat model for Huntington Disease. Moreover, in these studies the animals are monitored for a long period. As a result it becomes possible to assess long-term phenotypic characteristics. The main focus of these PhenoTyper studies is on establishing relevant parameters for this HD rat model, and thereby to accelerate new therapies.

Below we describe the primary outcome parameters per behavioural domain, and at what developmental stage we will measure these parameters:

Social behaviour: Social Interaction and ultrasonic vocalizations in the PhenoTyper: P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

Between the different symptoms, disrupted social behavior is significantly present in Huntington's Disease patients (Novak et al. 2010). Thus, in order to overcome social problems, non-drug based management of HD is usually applied, involving carers to help at home, residential or nursing home care and day centers to maintain social interactions (Novak et al. 2010). Social interactions are a fundamental and adaptive component of the biology of numerous species. Social recognition is critical for the structure and stability of the networks and relationships that define societies. For animals, such as rodents, recognition of conspecifics may be important for maintaining social hierarchy and for mate choice. To assess sociability in animal models, several behavioral tests have been developed (Kaidanovich-Beilin et al. 2011; Pietropaolo et al. 2011). Integrative research using animal models and appropriate tests for social behavior may lead to the development of improved treatments for social psychopathologies. Therefore, in order to find any elements of impaired social behavior, or social interest per se due to the disease, the PhenoTyper-9000 is used to monitor social interactions and investigate the influence of short-term social separation (1hr >24hrs) with simultaneous recordings of ultrasonic vocalizations.

Longitudinal approach:

1. BACHD transgenic and WT; P28-50 > P65-95 > 3-7 months > 8-12 months; Social Interaction and ultrasonic vocalizations in the Phenotyper > decapitation/perfusion*

Emotion (anxiety and depression): elevated plus maze, light/dark box test, Phenotyper: Light Spot Test, Discriminative Avoidance Task (DAT): P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

Although the onset of HD is clinically diagnosed on the basis of motor performance, symptoms of psychiatric disturbances such as anxiety, irritability, impulsivity, aggression, apathy and depressed mood are prevalent among pre-diagnostic HD gene carriers and patients with HD (Rosenblatt 2007, Folstein et al. 1983). As many as 40–50% of patients with HD are found to experience depression, and depressed mood may precede disease onset by 4–10 years (Folstein et al. 1983, Pflanz et al. 1991, Kirkwood et al. 2001, Duff et al. 2007). It is therefore important to recognize psychiatric symptoms in HD so that symptomatic treatment can be offered. This may be difficult later in the disease because diagnoses may be obscured by other features of the disease; depression, for instance, may be difficult to detect in a patient who has altered facial expressions and tone of voice. Conversely, metabolic symptoms such as weight loss and sleep disturbance may be wrongly attributed to depression. For these reasons it is of crucial importance to define when exactly anxiety and depression appear in the course of HD and define time windows for future interventions. This battery of tests will be used since these are validated and broadly used paradigms to assess depression and anxiety in rodent models (Aarts et al. 2015; de Heer et al. 2008; Bourin et al. 2003; Walf et al. 2007). In addition, classical paradigms will be combined with automated tasks assessed in the Phenotyper.

Longitudinal approach:

2. BACHD transgenic and WT; P28-50 > P65-95 > 3-7 months > 8-12 months; [elevated plus maze, light/dark box test]; [Phenotyper: Light Spot Test, Discriminative Avoidance Task (DAT)] > decapitation/perfusion*.

(Sensori-) Motor function: Grip strength test, holding bar, static rod, prepulse inhibition, Phenotyper: Home cage screening & circadian rhythm: P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood).

Sensori-motor functions are closely dependent on the integrity of the brain and nervous system. Disturbances in motor function are the most apparent signs of HD. Chorea, a dance-like involuntary movement, is the major motor symptom in HD and is seen in over 90% of patients with this disorder (Hayden 1981, Folstein et al. 1986). Bradykinesia, a slowness in the performance of voluntary movements, and rigidity, a resistance to passive joint movements, often develop as the disease progresses and become dominant in the late stages of the disease (Young et al. 1986, Thompson et al. 1988). Similarly, dystonia, involuntary muscle contractions that can cause twisting and abnormal postures, is a feature of advanced stages of disease (Young et al. 1986, Bittenbender et al. 1962). Other signs of motor deficits are early impairment of voluntary motor function, difficulties with fine motor control and gait disturbances. Dysarthria, speech abnormalities as a result of dysfunction of the motor component of speech production, is present early in the illness and becomes more pronounced with disease progression. Finally, difficulties in swallowing, termed dysphagia, develop in advanced stages of HD and may lead to choking. Standardized tests have been developed to assess these functions in rodents (Aartsma-Rus et al. 2014; Deacon et al. 2013). Indeed, (sensori-)motor function consists of several parameters that can be assessed with validated

paradigms measuring muscle strength, fine motor control, locomotor and general activity and circadian rhythm. The combination of classical and Phenotyper tests will shed light on the different sensorimotor impairments of the different rat models.

Longitudinal approach:

3. BACHD transgenic and WT; P65-95 > 3-7 months > 8-12 months; [Grip strength test, holding bar, static rod] and [Phenotyper: Home cage screening & circadian rhythm] > decapitation/perfusion*.

After completion of the behavioural test animals will be sacrificed either by decapitation or by perfusing them in order to evaluate the molecular correlates of the behaviour paradigms. Like mentioned before, we are giving priority to the completeness of a longitudinal study rather than to the investigation of the molecular markers at different ages, which would lead to sacrifice several animals during the course of the study. The detection of some interesting and subtle phenotypic traits could occur at late developmental stages and only longitudinal individualized screening provides the highest likeliness to reliably identify subtle phenotypes. Our main interest is the assessment and quantification of serotonin receptors and transporters as well as markers of neuroplasticity and neuronal degradation. The relationship between serotonin and anxiety, depression and social behaviour has been extensively studied (Graeff et al. 1996, Baldwin et al. 1995, Deakin et al. 1998, Ago et al. 2014, Yoshimi et al. 2014) but the precise choice of the markers will be defined during the behavioural testing, based on the outcome of the different behavioural tests.

*In order to reveal the brain correlates of the behavioural phenotypes identified in the behavioural tests rats will be killed, either by decapitation or perfusion. Decapitation will be applied when fresh brain material is needed, e.g. for the assessment of protein or mRNA levels, or for neurochemical assessments. Perfusion will be applied when fixed brain material is needed, for immunohistochemistry. The choice of the method will be based on the results obtained from the behavioral tests.

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

BACHD transgenic rats (heterozygous) and wild type (WT) littermates will be bred in the facility and then tested across developmental stages. For breeding, BACHD males will be paired with wild type females under the housing conditions normally in use at the facility. In the experimental approach the behavioural tests and the time windows at which the animals will be tested are defined, specifying the tests performed by each batch of animals. Below we provide details of the behavioural tests and the decapitation/perfusion.

Batch 1: Anxiety and Depression

Light spot test: the light spot test is a novel, automated assay for anxiety-related high-throughput testing of rodents in an automated home-cage environment (Aarts et al. 2015). After a period of at least 3 days that the test animal is housed in the PhenoTyper* under reversed daylight, during which several parameters representing novelty and habituation are measured, a focused light beam is projected on the feeding area during the first three hours of the dark phase, i.e. the active period of the animal. This induces an approach-avoidance dilemma for the animal: the choice between

approaching the feeder and avoiding the aversive bright light. During this 3-hour time window the animal has the opportunity to display a large variety of responses: from seeking shelter, exploring the area around the illuminated zone to ignoring the light and eating. The animal's behaviour will be continuously recorded by video tracking software (at P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

DAT (Discriminative avoidance task): the DAT is a useful test to investigate the critical relationship between learning/memory and anxiety (de Heer et al. 2008). During habituation to the PhenoTyper* (day 1-4), the animals are observed and data are continuously collected using Ethovision. At day 4, for each animal it is determined which of the two entrances of the shelter is preferred. After that, every time the animal gets in the shelter using the preferred entrance a light is switched on and it remains on as long as the animal stays in the shelter. As soon as the animal leaves the shelter the light goes off. When the animal uses the other entrance of the shelter no light is presented. The test lasts around 4 days, dependent on the acquisition of the individual animals. When and if the animals show a clear shift of preference (i.e. > 70% use of the non-lighted entrance), a reversal protocol is started to measure flexibility of learning (at P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

Light/Dark box: the light/dark test is an useful test to predict anxiolytic-like or anxiogenic-like activity in rodents (Bourin et al. 2003). It is based on the innate aversion of rodents to brightly illuminated areas and on the spontaneous exploratory behaviour of rodents in response to mild stressors, that is, novel environment and light. The test apparatus consists of a small dark safe compartment (one third) and a large illuminated aversive compartment (two thirds). Transitions have been reported to be an index of activity-exploration because of habituation over time, and the time spent in each compartment to be a reflection of aversion (at P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

Elevated plus maze: The elevated plus maze is a well-characterized behavioral paradigm to define brain regions and mechanisms underlying anxiety-related behavior (Walf et al. 2007). The maze contains two open arms and two closed arms. The test relies upon the animal's natural tendency to stay in enclosed spaces and their avoidance for open spaces and heights – anxious animals will spend more time in the closed arms than less anxious animals and show a longer latency to first enter the centre area or open arms (at P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

Batch 2: Social behaviour

Social testing & Ultrasonic vocalizations: In order to find any elements of disrupted social behavior, or social interest per se due to the disease, the PhenoTyper*-9000 is used to monitor social interactions and investigate the influence of short-term social separation (1hr >24hrs) with simultaneous recordings of ultrasonic vocalizations (USV). Social interactions and USV's will also be measured when the animals are reunited again. With Ethovision software, approach and avoidance, the distance between the animals and proximity is automatically registered and calculated (at this moment only available for short-term monitoring up to 1-2 hrs) (at P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

Batch 3: (Sensory)-motor functions

Grip-Strength Test: the grip strength test is a widely-used non-invasive method designed to evaluate rodents limb strength that has been used to investigate the effects of neuromuscular disorders and drugs (Aartsma-Rus et al. 2014). It is based on the natural tendency of a mouse/rat to grasp a bar or grid when it is suspended by the tail. During this test the animal grips with both forelimbs (or hind-limbs) a single bar or a mesh. The purpose of this assay is to assess the animals fore and/or hind limb strength. This method can be used to measure disease progression and neurobehaviour as well as to test effect of specific therapeutic interventions in mouse/rat models of neuromuscular disorders; increases in grip strength have been interpreted as evidence of increased muscle strength. Since the test has to be performed one animal at a time with a period of

rest time between each of the three-five trials per animal it requires several minutes (5-9 minutes). For this test a grip-strength device will be used that can measure and record the grip-strength (at P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood)).

Holding Bar (or Hanging test): seeks to evaluate motor function and deficit in rodent models (Aartsma-Rus et al. 2014). The animal is placed in order that can grab the bar and is suspended above the floor. The test thus begins with the animal hanging from an elevated bar; the latency to when the animal falls is recorded. Alternatively a box filled of water can be placed on the bottom to motivate the animals to hold the bar. The test is performed three days per week with three trials per session. Testing typically lasts from one up to three weeks.

Static rod: to define the onset of motor symptoms, motor coordination will be tested in a 'turning task', by placing each rat at the end of a suspended, horizontal wooden rod (Deacon et al. 2013). The output consists of two measures: orientation time (time taken to orientate 180° from the starting position towards the shelf) and transit time (the time taken to travel to the shelf end (nose beyond the 10 cm mark from the shelf end of the rod) (at P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-7 months (middle adulthood), 8-12 months (late adulthood))).

Ex vivo

Based on the outcome of the behavioural tests, the animals will be sacrificed either by decapitation or by perfusion. The choice of the method will be then made according to the readouts of the different tests. We estimate that each method will be used in 50% of the animals (50% decapitation, 50% perfusion).

Decapitation: Rats are handled, transported from experimental room to decapitation room, and within one second decapitated using a guillotine, by an experienced experimenter. The decapitation is done without anesthesia, because anesthesia is known to interfere with gene expression. It also causes unnecessary injection pain to the animal. The decapitation in our hands is so quick that the animal has no time to notice what happens.

Perfusion: the rats will be anesthetized using sodium pentobarbital (90 mg/kg). Paw reflex needs to be assessed to ensure that the rat is fully anesthetized. Rat's thorax will be opened and a needle (1,5 x 43 mm) will be placed in the left ventricle of the heart. Then liver will be cut open to drain the blood. The rat will be perfused with saline until the liver turns pale. The animal will be perfused using 300 ml of paraformaldehyde (PFA). Then jaws needs to be checked (if they are stiff) trying to open the mouth. The brain will be then removed and fixated in PFA at 4°C. In the end the tissue will be stored in 0.1M PBS at 4 °C.

*Phenotyper (Noldus Information Technology): specially designed cages for recording and video-tracking of home cage activity. Each cage contains a top unit with built-in hardware for videotracking, i.e. a digital infrared- sensitive video camera and infrared lights. These provide constant and even illumination of the cage. An infrared filter placed in front of the camera prevented interference with room illumination. This method allows continuous behavioural recordings in both dark and light periods. The cages (PT4500: 45x45 cm; PT9000: 90x90cm) are made of transparent perspex walls with an aluminium floor covered with sawdust and paper shreds. A feeding station and a water bottle are attached to the outside of a cage wall. A shelter (height: 10 cm, diameter: 9 cm; non-transparent material) was fixed in one of the corners. The PT4500 version will be used for all the experiments using a Phenotyper except from the Social testing where the PT9000 will be used.

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 animals used for the breeding was calculated considering data acquired from our [REDACTED] (see table below).
Animals for registration (depicted in red) have been counted in accordance with the instructions given from the NVWA.

We estimate that we need approximately 12 rats per group (Jansson et al 2014, FIG.1). In the social interaction test the animals will be assessed in pairs and a pair in such experiment is considered as a statistical unit. Therefore, in this experiment a number of 24 animals per genotype (24 w.t and 24 transgenic) is required to reach statistical significance. We will calculate the precise group sizes per animal model using a power analysis, based on data collected so far by us and others.

· **Batch 1:** It consists of 24 control (12 male and 12 female) animals and 24 transgenic (12 male and 12 female). This batch is going to be:
o Individually tested for anxiety and depression using the following paradigms and at the following ages: elevated plus maze, light/dark box test, Phenotyper: Light Spot Test, Discriminative Avoidance Task (DAT): P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-6 months (middle adulthood), 9-12 months (late adulthood).

· **Batch 2:** It consists of 48 control (24 male and 24 female) animals and 48 transgenic (24 male and 24 female). This batch is going to be:
o Tested in group of two rats for social behaviour using the following paradigms and at the following ages: social Interaction test and ultrasonic vocalizations in the Phenotyper: P28-50 (corresponding to adolescence), P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-6 months (middle adulthood), 9-12 months (late adulthood).

· **Batch 3:** It consists of 24 control (12 male and 12 female) animals and 24 transgenic (12 male and 12 female). This batch is going to be:
o Individually tested for (Sensory-) Motor function using the following paradigms and at the following ages: holding bar, grip strength test, static rod: P65-95 (corresponding to early adulthood), 3-6 months (middle adulthood), 9-12 months (late adulthood).

Total of animals: 15 breeding males + 52 BACHD males + 48 WT males + 52 BACHD females + 48 WT females = 215 animals

(Total of animals needed in the experiments: $(4 \times 24) + (2 \times 48) = 192$ rats)

Number of animals paired F = females M = males	Expected number of litters	Expected number of pups	Expected number of males pups	Expected number of female pups
45 30 WT females (F) 15 BACHD males (M)	25	250	73 WT (48 used in experiment) 52 BACHD (48 used in experiment)	73 WT (48 used in experiment) 52 BACHD (48 used in experiment)

The number of animals used for the breeding was calculated considering data acquired from our



- 1) The average litter size was about 10 pups,
- 2) The breeding success was 80%,
- 3) The ratio BACHD: WT was about 5:7,
- 4) The expected ratio males: females is about 50: 50.

B. The animals

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

BACHD transgenic (TG) rats bred on a Sprague Dawley background and wild type (WT) littermates will be used in the study. This rat model (see project proposal) has been chosen because it mimics the genetic factor responsible to HD symptoms development in humans. Rat have a more elaborative behavioural repertoire compared to mice, and therefore they are the species of choice for extensive behavioural phenotyping of complex neuropsychiatric and neurological disorders. Moreover, there are largely documented sex differences in anxiety (Gater et al, 1998; Kessler et al, 1994) and previous studies have shown that male and female react differently to stressful or threatening stimuli. Sex differences have also been noted in social behaviour studies (Stack et al. 2009). Therefore we want to perform the different experiments in both male and female animals.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	Own breeding	215	P1 up to 12 months

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 perform behavioural studies to investigate neurological and neuropsychiatric disorders. Because of the complexity of these kind of disorders, it is impossible to use lower-order animals. Furthermore, in a model like the BACHD rat model we can study the onset and development of disease-symptoms from an early age on. This may also allow to investigate preventive treatments in a later stage of research. Such a longitudinal approach, which is part of this project, is very time consuming and costly in humans, and therefore rarely done. In addition, specific brain mechanisms and behaviors 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. In case of the experiments conducted in the PhenoTyper, more data per animal is obtained (continuous monitoring for hours up to several days) with a reduction of the number of animals needed. In the case of the classical paradigms instead, the selection of the different kind of tests has been strict, including only essential paradigms for the purpose of the study. Furthermore, since longitudinal experiments will include the usage of the same animals throughout the study, this will lead to minimal amount of animals needed.

REFINEMENT: Since in part of the experiments the rats are placed in the PhenoTyper where multiple tests can be performed, handling and other human interventions are minimized, resulting in a reduction of stress for the animal, and thus in more reliable results. All the paradigms are painless and non-invasive tests. Furthermore, social housing, cage enrichment, handling and day/night rhythm will be applied.

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

Animals will be monitored daily and closely by the caretakers, weighed and scored individually for signs of discomfort and checked twice a week to be able to detect Human End Point conditions. Furthermore, the use of a completely automated video tracking system for continuous experiments, reducing the handling, minimizes the human intervention that may cause stress for the animals. Also, habituation to housing, day/night rhythm and handling will be applied.

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.

Perfusion will take place under deep anesthesia.

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

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The rats may experience psychological stress (e.g. Light Spot, light/dark box) in the behavioural tests, but this is not associated with physical damage. In the light/dark box test, rats may experience stress since novel environment and light are considered mild stressors. The same applies to the Light Spot test, with the difference that rats are housed in such a safe environment as the Phenotyper. In the Phenotyper 4500 the rats are socially isolated, which causes mild stress to social rats. In the Phenotyper 9000 social interaction will be assessed using cagemates, and acclimatization to the new environment will be provided prior to testing. The other behavioural tests are minimally stressful. The stress involves the placement of the animal in a new environment (e.g. static rod test), effects of which may be comparable to the effects of cage cleaning. No adverse effects are expected immediately before the killing.

Specific line discomfort:

The BACHD transgenic rats are expected to develop severe physiological abnormalities starting from 18 months of age. It is indeed correct that full-blown disorder symptoms will only be seen in 18 month and older rats. However, it cannot be concluded from this that the health status of the transgenic and wild-type rats is similar. That is not known and will be investigated in this project. Indeed, we aim at assessing phenotypes preceding the full-blown disorder symptoms. Since it is unlikely that symptoms suddenly appear at 18 months of age, we expect the arise of moderate symptoms in BACHD transgenic animals before the onset of the HD symptoms. Since wild-type control animals do not develop HD symptoms, we expect that they will also not develop symptoms that precede HD, and thus that their suffering is mild.

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress in the first place. This stress is about equal to cage cleaning. In all the home-cage tests performed in the Phenotyper, the use of a completely automated video tracking system for continuous experiments reduces the handling, the human intervention and the consequent stress to the very minimum.

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

The goal is to follow the development of phenotypes that precede the manifestation of full-blown disorder symptoms with the future aim of testing useful therapies and validating parameters for Huntington's Disease. As such, the (mild) adverse effects caused by the behavioral testing itself cannot be avoided. Information on the development of the main symptoms is thus necessary and are the core of the study. Animals will be monitored closely (during Phenotyper monitoring and repeated behavioural testing), weighed and scored individually for signs of discomfort and

checked twice a day to be able to detect humane end point conditions. Additionally, the use of a completely automated video tracking system for continuous experiments, reducing the handling, minimizes the human intervention that may cause stress for the animals. Also, habituation to housing, day/night rhythm and handling will be applied.

Concerning the decapitation/perfusion there are no prevention measures, because the goal is to kill the rats to obtain brain material. **However, the rats are habituated to handling and will be used to this, even more because they have been subjected to repeated behavioural tests, including handling. It is known that rats get used to this very easily and then do not show signs of stress by handling. The animals will be decapitated by familiar and skilled persons, reducing the risk of stress to the minimum.**

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 criteria to take the animal out of the experiments are based on human observation of factors known as clear symptoms of pain/stress/discomfort and defined for humane end point detection*. Weight loss of more than 15%-20% in one day is considered as a humane endpoint. Also (a combination of) general symptoms such as raised fur, hunched back (arched back), poor coat conditions, are also considered as humane endpoints after which the animals should be euthanized. All the criteria that have been considered in the past, during other experiments, as "humane endpoints" will be further clarified by being intensively in contact with the veterinarians at [REDACTED].

*Standard human endpoints rodents: piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor self-care, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, elephant teeth.

BACHD transgenic rats: during an observation period of 18 months no increased mortality was observed (non published data from our [REDACTED]). In previous findings the BACHD rats reached the HEP at >18 months of age, which was the endpoint the researchers had determined because of the severity of the symptoms that the animals had developed. **This is not the case since the last time point of testing will be 12 months of age: previous findings (Yu-Taeger et al. 2012, Abada et al. 2013a,b) suggest that mild to moderate symptoms can appear during this time span.**

Indicate the likely incidence.

Once again, the transgenic BACHD rats will reach the human endpoint at 18 months of age but tests will be performed until 12 months of age so we expect that the incidence will be <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 control group that will be used for the experiments and the transgenic animals used for breeding (52% of total number of animals) will experience mild discomfort.

The transgenic adult animals will be tested until 12 months of age and will develop disease symptoms. This group of animals will therefore experience moderate discomfort later in life (48% of total number of animals).

Classification = (WT+BACHD) Mild for breeding, behavioural tests and decapitation + perfusion (52% of total number of animals);

Classification = (BACHD) Moderate (max) for disease development* (48% of total number of animals)

*The BACHD transgenic rats are expected to develop symptoms that will ultimately lead to the HEP at 18 months of age. During the HEP stage the animals will have severe symptoms. Thus, since we aim at assessing phenotypes preceding the full-blown disorder symptoms the experiments will be carried out during a period of 12 months, starting from 1 month (batches 1 and 2) and 2 months (batch 3) of age. During this stage of (disease) development there will be a gradual arise of symptoms. We therefore estimate the discomfort to be maximally (at a later stage during the project when the disease symptoms develop) 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.

We need the rat brains to measure the molecular mechanisms underlying emotion, social as well as motor-related behaviour in BACHD rats.

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 2015-0100
2. Titel van het project: Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar het effect van genetische veranderingen in ratten op de ontwikkeling van Huntington's Disease
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: 25-08-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 08-09-2015 en 06-10-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 15-09-2015 tot 22-09-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-09-2015
 - advies aan CCD: 02-11-2015
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: 15-09-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Niet-technische samenvatting:**
 - 3.5 Het percentage van de dieren waarop de verschillende ongeriefclassificaties van toepassing zijn is niet aangegeven.
 - 4.1 In zijn algemeenheid is onderzoek naar Huntington's disease wel mogelijk in bijvoorbeeld zebrafissen, hoewel niet het beoogde gedragsonderzoek. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.
 - Project Proposal:**

- 3.1 De rationale voor het uitgebreid karakteriseren van deze transgene dieren is onvoldoende duidelijk gemaakt. Voor welk onderzoek dat niet in patiënten kan worden uitgevoerd is deze uitgebreide karakterisering noodzakelijk?
- 3.2 De commissie verzoekt u hier alleen het doel van deze projectaanvraag te vermelden. Het tekstblok " We will specifically focus on.....[]....applying novel substances for the treatment of HD" past beter bij punt 3.4
- 3.3 In de laatste zin van dit gedeelte verwijst u terloops naar het feit dat u "funding" hebt verkregen voor dit project, kennelijk om daarmee het belang te benadrukken. De commissie is het met u eens dat het feit dat u van de EU financiering hebt verkregen voor dit project en dat het project is ingebed in "Phenorat", laat zien dat het belang van uw project onafhankelijk getoetst is door vooraanstaande vakgenoten. U zou dat echter dan ook duidelijk zo moeten vermelden. De terloopse verwijzing naar "funding" wordt wellicht niet zo begrepen.
- 3.4.2 De proef duurt 12 maanden. Kunt u uitleggen en verantwoorden waarom u een vergunning voor 5 jaar nodig zou hebben?

Description of Animal Procedures:

-DAP

*I. De BACHD transgene ratten zullen pas vanaf 18 maanden ernstige motorische cognitieve en fysiologische abnormaliteiten ontwikkelen. Tot die tijd is hun gezondheidstoestand vergelijkbaar met wild-type muizen uit hetzelfde nest. Tegelijkertijd schrijven de onderzoekers dat het ongerief door het genotype in de leeftijdsfase waarin de dieren worden getest mild tot matig is. De commissie is van mening dat deze beweringen in tegenspraak met elkaar zijn.

*J. Uit eerdere bevindingen bleken de BACHD ratten vanaf 18 maanden het humane eindpunt te bereiken vanwege de ernst van de symptomen die de dieren in de daaraan voorafgaande periode hadden ontwikkeld. Waarom verwachten de onderzoekers dat de BACHD ratten in dit experiment deze symptomen pas vanaf 18 maanden zullen ontwikkelen (zie vorige vraag en de informatie gegeven bij onderdeel I)?

*K: Waarom schatten de onderzoekers het ongerief voor de transgene dieren in als matig wanneer zij niet oud genoeg worden om symptomen van de ziekte te ontwikkelen en gedragstesten ondergaan die slechts licht ongerief veroorzaken? Onder K dient u ook weer te geven welk percentage van de proefdieren het respectievelijke ongerief zal ondergaan.

- Datum antwoord: 22-09-2015

- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-3.5 This is now added to the NTS.

-4.1 Reference to this example, and why it cannot be used, is now added to the NTS.

Project Proposal:

-3.1 A new section has been added to explain the urgency of the characterization of animal models of Huntington's Disease and why these kind of studies cannot be carried out in patients.

-3.2 This section has been moved to section 3.4.1.

-3.3 More details about the funding have been included in the relevant section.

-3.4.2

The licence time has been reduced to two years, considering the time needed for the behavioural and the molecular studies.

Description of Animal Procedures:

* I. It is indeed correct that full-blown disorder symptoms are only seen in 18 month and older rats. However, it cannot be concluded from this that the health status of the transgenic and wild-type rats is similar. That is not known and will be investigated in this project. Indeed, we aim at assessing phenotypes preceding the manifestation of the full-blown disorder symptoms. Since it is unlikely that symptoms suddenly appear at 18 months of age, we expect the arise of moderate symptoms in transgenic animals before the onset of the HD symptoms. Since wild-type control animals do not develop HD symptoms, we expect that they will also not develop symptoms that precede HD, and thus that their suffering is mild.

*J. Based on previous findings, we expect that the transgenic animals will start to develop mild to moderate symptoms during the 12 months of testing. In fact, the aim of the proposed project is to identify time windows during which each class of symptoms will start appearing.

* K: The transgenic rats are expected to develop symptoms that ultimately will lead to the HEP at 18 months of age. During the HEP stage the animals will have severe symptoms. In the preceding phase, the symptoms are expected to be moderate. The symptoms are not likely to be mild, because there will be gradual build-up of symptoms that ultimately lead to the HD systems at 18 months of age. See also our answer to point I

- 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 phenotype this rat model for Huntington's Disease in order to define behavioural features that precede the manifestation of the full-blown disorder symptoms'. De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken welke afwijkingen op het gebied van sociaal gedrag, emoties of motorische functies optreden voordat de typische symptomen van de ziekte van Huntington zich openbaren bij de transgene ratten. Voorts wordt duidelijk of er veranderingen zijn in bijvoorbeeld eiwitten of mRNA in bepaalde hersengebieden die deze afwijkingen zouden kunnen verklaren. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot begrip van de manier waarop deze neurodegeneratieve ziekte zich ontwikkelt en uiteindelijk mogelijk tot de ontwikkeling van interventies. De ziekte van Huntington is een erfelijke ziekte die zich doorgaans openbaart tussen het 35^e en 50^e levensjaar. Symptomen zijn ondermeer onwillekeurige bewegingen, verstandelijke achteruitgang en verandering in persoonlijkheid. Er is geen therapie voor deze progressieve ziekte, waaraan patiënten gemiddeld na 19 jaar overlijden. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van interventies die de progressie van de ziekte afremmen.
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 optreden van afwijkingen voordat de typische symptomen van deze neurodegeneratieve ziekte zich openbaren bij deze transgene ratten. De commissie is verder van mening dat ruim voldoende aannemelijk is gemaakt dat de bevindingen in het gekozen genetische gemodificeerde ratmodel relevant kunnen zijn voor de situatie in humane patiënten.
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 en de fok is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de ontwikkeling van de ziekte van Huntington met de bijbehorende neurodegeneratieve processen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde gedragstesten in als licht. Het ongerief als gevolg van de ontwikkeling van de ziekte is uiteindelijk matig, aangezien de dieren worden gedood voordat ernstige symptomen van de ziekte optreden. De DEC is van mening dat de combinatie van al deze factoren leidt tot licht ongerief voor de dieren in fok en de wildtype dieren en tot maximaal matig ongerief voor de volwassen transgene dieren. Het cumulatief ongerief voor de ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 71% 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. Een neurodegeneratieve ziekte die gedragsafwijkingen veroorzaakt 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. De longitudinale aanpak waarbij meerdere metingen op dezelfde dieren worden gedaan voorkomt onnodig gebruik van proefdieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 167 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. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Door gebruik van de Phenotyper kooien ondergaan de dieren minder handelingen, en kunnen er continu data verzameld worden over het gedrag van de dieren. 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.

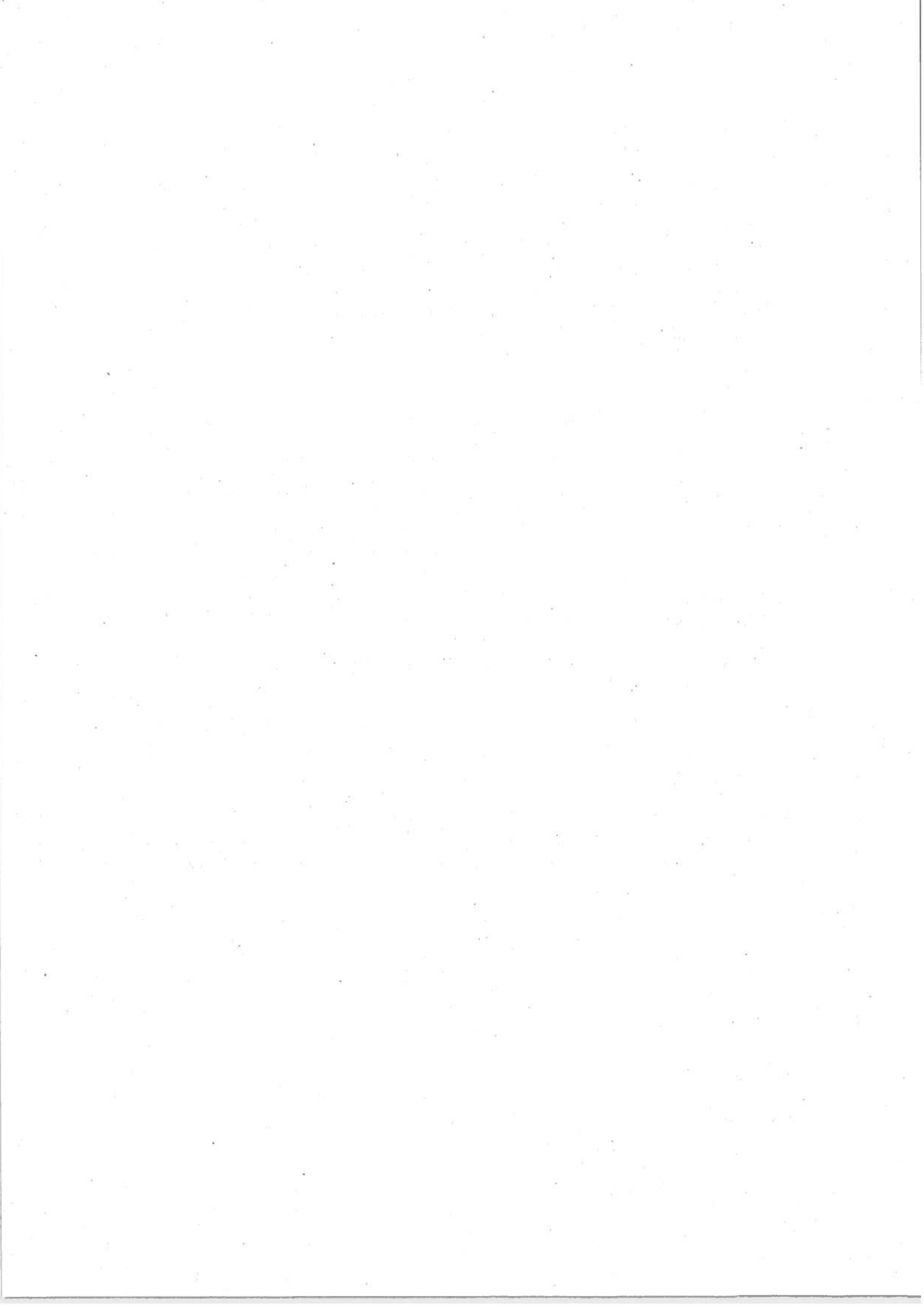
Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het optreden van afwijkingen op het gebied van sociale interacties, motorische functies en emoties voordat de typische symptomen van de ziekte van Huntington zich openbaren bij ratten met een erfelijke aanleg voor deze ziekte. De resultaten zullen inzicht geven in de manier waarop deze neurodegeneratieve ziekte zich ontwikkelt. Deze inzichten kunnen mogelijk tot de ontwikkeling van interventies leiden die de progressie van de ziekte bij mensen afremmen. Het belang van meer inzicht in de manier waarop de ziekte van Huntington zich ontwikkelt en het beschikbaar komen van interventies acht de DEC substantieel, gezien de ernst van deze aandoening.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 71% van de dieren licht ongerief en 29% van de dieren matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de gedragstesten en de ontwikkeling van de ziekte van Huntington. 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 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.



Radboud universitair medisch centrum
Concernstaf, sectie Kwaliteit en Veiligheid

████████████████████
Postbus 9101, ██████████
6500 HB Nijmegen

████████████████████
Postbus 9101, ██████████
6500 HB Nijmegen
████████████████████

KvK 41055629/4

Datum ██████████
2 november 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 ██████████ als gemachtigde van de vergunninghouder. Hiervoor AUB het bij u bekend e-mailadres ██████████ en **bovenstaand postadres** ██████████, Postbus 9101, ██████████, 6500 HB Nijmegen) gebruiken.

Om verwerking door de financiële afdeling mogelijk te maken verzoeken wij **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: 2015-0100
Verantwoordelijk onderzoeker: ██████████

Bij voorbaat dank.

Met vriendelijke groeten

████████████████████
████████████████████
████████████████████



> 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
AVD103002015302

Bijlagen

2

Datum 5 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015302. 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, t.a.v. [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

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? 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: 1 december 2015
Geplande einddatum: 1 december 2017
Titel project: Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar het effect van genetische veranderingen in ratten op de ontwikkeling va
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: 2 november 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
AVD103002015302

Bijlagen

2

Datum 5 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 5 november 2015

Vervaldatum: 5 december 2015

Factuurnummer: 15700302

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015302	€ 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: Info-zbo
Verzonden: woensdag 11 november 2015 13:26
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvullende informatie aanvraag AVD103002015302
Bijlagen: Aanvullende informatie AVD103002015302.pdf

Geacht [REDACTED]

Op 2 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease', met aanvraagnummer AVD103002015302. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In de bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]

6500HB 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
AVD103002015302

Datum 11 november 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen

1

Geachte [REDACTED]

Op 2 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease', met aanvraagnummer AVD103002015302. 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 uw aanvraag beschrijft u van plan te zijn alleen mannelijke ratten te testen. 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 dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Wij vragen u deze informatie te verstrekken.

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. 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).

Datum

11 november 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015302

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



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



Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 12 november 2015 9:41
Aan: 
Onderwerp: aanvullende informatie AVD103002015302

Geachte DEC leden,

Op 2 november heeft u advies aan de CCD gebracht op aanvraag AVD103002015302, met titel 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease', uw kenmerk: 2015-0100.

We begrijpen uit de tekst van de aanvraag dat mannelijke ratten vanaf 1 maand oud langere tijd achter elkaar individueel in de Phenotyper 4500 gehuisvest worden. Zou u toe kunnen lichten hoe u tot de ongerief classificatie licht bent gekomen?

De aanvrager beschrijft in zijn aanvraag gebruik te willen maken van alleen mannelijke ratten in zijn experimenten. We hebben de aanvrager rechtstreeks gevraagd om zijn keuze te onderbouwen.

In verband met doorlooptijd willen we u vragen om uiterlijk vrijdag, 13 november 2015, op deze email te reageren.

Alvast hartelijk dank voor uw medewerking.

Met vriendelijke groet,



Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

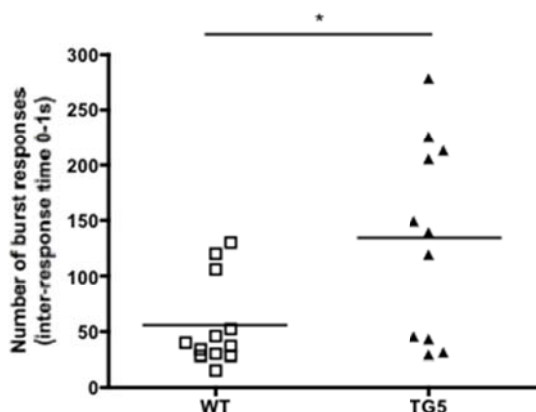
Dear Committee members,

Thank you for your review of project-license proposal AVD103002015302, named 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease'. Below you can find the point raised and a justification for that.

In uw aanvraag beschrijft u van plan te zijn alleen mannelijke ratten te testen. 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 dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Thank you for your insightful comment. Because we will breed the BACHD rats ourselves, we will generate both male and female rats. We agree that the experimental use of the female rats to gain insight in sex differences in behaviour preceding the onset of HD is more justified than not using the female rats. This is also scientifically relevant, as there are documented sex differences in anxiety (Gater et al, 1998; Kessler et al, 1994) and social behaviour (Stack et al, 2010), behavioural components that will be measured in this project. It is the traditional or conservative idea that females are intrinsically more variable than males and must be tested at each of four stages of the estrous cycle to generate reliable data. We recently came across a meta-analysis which concluded that variability was not significantly greater in females than males for any endpoint (Prendergast et al, 2014). The authors also indicate that utilization of female mice in neuroscience research does not require monitoring of the estrous cycle. Therefore, we can readily include female rats in our project.

On the other hand, our collaborators working with this rat model have always been using male rats. Thus, since all the results we have so far are coming from male rats we would like to correlate the results between male and female to assess if the results are comparable in our type of research. Based on published work (Jansson et al, 2014 FIG.1) and previously collected data on an impulsivity task (DRL) a power analysis has been performed to calculate the number of male rats needed in this experiment. The calculation was performed using G*Power (vers. 3.1) using a power of 0.80 and an alpha error probability of 0.05.



Genotype	WT	BACHD
Average	59.50	134.2
Standard Deviation	39.56	88.66
Distribution	normal	normal

Figure 1: Number of burst responses (0-1s) of wild-type and BACHD male animals in the DRL-10. Left: graph, right: tabular representation.

From the results below it can be seen that 12 male rats per group are needed:

Analysis: A priori: Compute required sample size – given alpha, power, and effect size

Input:

Tail(s) = One

Effect size $d = 1.088131$

α err prob = 0.05

Power ($1 - \beta$ err prob) = 0.80

Allocation ratio $N2/N1 = 1$

Output:

Noncentrality parameter $\delta = 2.6653657$

Critical $t = 1.7171444$

Df = 22

Sample size group 1 = 12

Sample size group 2 = 12

Total sample size = 24

Actual power = 0.8256541

We will therefore use 12 male rats for each group (24 for the social interaction experiment) to reach statistically significant differences. Since we expect sex differences in the behaviours and all previous data have been collected with males we will use the same number of male ($n=12$) and female ($n=12$) animals for each group. In this way we have sufficient statistical power to assess the presence or absence of differences between sexes. Since female animals will be born and registered anyway (breeding with discomfort) this will only cause a small increase in the overall number of animals used. While, by including the females in this experiment instead of euthanizing them, we will gather valuable information and be able to assess whether or not male and female animals can be combined in one group (6 males and 6 females) for future studies, without loss of power.

We have adjusted the project accordingly.

If you need further clarifications don't hesitate to contact us.

Best regards,



References:

Gater R, Tansella M, Korten A, Tiemens BG, Mavreas VG, Olatawura MO (1998). Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings: report from the World Health Organization Collaborative Study on Psychological Problems in General Health Care. Arch Gen Psychiatry 55: 405–413.

Jansson EKH, Clemens LE, Riess O, Nguyen HP (2014). Reduced motivation in the BACHD rat model of Huntington disease is dependent on the choice of food deprivation strategy. *PLoS One*; 9: e105662.

Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, Wittchen HU, Kendler KS (1994). Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch. Gen. Psychiatry* 51: 8–19.

Prendergast B, Onishi K, Zucker I (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 40: 1-5.

Stack A, Carrier N, Dietz D, Hollis F, Sorenson J, Kabbaj M (2010). Sex Differences In Social Interaction in Rats: Role of the Immediate-Early Gene *zif268*. *Neuropsychopharmacology*. 35: 570-580

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 13 november 2015 16:57
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: aanvullende informatie AVD103002015302

Geachte CCD,

De dieren zullen ca. 8 dagen achter elkaar solitair gehuisvest zijn in de Phenotyper. In eerste instantie heeft de commissie dit als licht ongerief ingeschaald, mede vanwege het feit dat de dieren in dezelfde kamer, waar zij elkaar kunnen zien en ruiken, zullen worden gehuisvest. Een verblijf van 8-9 dagen is niet echt langdurig, maar ook niet kort. In combinatie met de gedragstesten die de dieren ondergaan, wordt het ongerief voor de dieren matig. Wat dit betreft wil de commissie haar mening dus herzien, en schat het ongerief voor de dieren die in de Phenotyper een gedragstest ondergaan in als matig.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
Concernstaf Kwaliteit en Veiligheid
[REDACTED]
M
[REDACTED]
[REDACTED]

Radboud universitair medisch centrum

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]

Geert Grooteplein 10 [REDACTED]

www.radboudumc.nl

Aanwezig: ma, di en do van 9.00 – 15.00 uur

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: donderdag 12 november 2015 9:41
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD103002015302

Geachte DEC leden,

Op 2 november heeft u advies aan de CCD gebracht op aanvraag AVD103002015302, met titel 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease', uw kenmerk: 2015-0100.

We begrijpen uit de tekst van de aanvraag dat mannelijke ratten vanaf 1 maand oud langere tijd achter elkaar individueel in de Phenotyper 4500 gehuisvest worden. Zou u toe kunnen lichten hoe u tot de ongerief classificatie licht bent gekomen?

De aanvrager beschrijft in zijn aanvraag gebruik te willen maken van alleen mannelijke ratten in zijn experimenten. We hebben de aanvrager rechtstreeks gevraagd om zijn keuze te onderbouwen.

In verband met doorlooptijd willen we u vragen om uiterlijk vrijdag, 13 november 2015, op deze email te reageren.

Alvast hartelijk dank voor uw medewerking.

Met vriendelijke groet,



Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

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.

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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN (route 231)



**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
AVD103002015302
Bijlagen
1

15 DEC. 2015

Datum
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 2 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat" met aanvraagnummer AVD103002015302. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 19 november 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vraag van de CCD over het geslacht van de proefdieren beantwoord. U heeft de aanvraag herzien na de vragen van de CCD en op 19 november een aangepaste versie van de projectaanvraag gestuurd.

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 en hieronder gemotiveerd. U kunt met uw project "Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 december 2015 tot en met 1 december 2017. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de datum 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 2 november 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 13 november 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen vragen over het ongerief veroorzaakt door de individuele huisvesting in de Phenotyper.

Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies en in de nadien ingekomen reactie van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie grotendeels 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.

De CCD stelt in aanvulling een algemene voorwaarde en een specifieke voorwaarde aan dit project. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld om te voldoen aan dat gene wat volgt uit dit artikel. De specifieke voorwaarde betreft de acclimatisatie periode van de dieren aan de omgedraaide dag/nacht ritme. De CCD acht het noodzakelijk dat de acclimatisatie periode voldoende is om het dierenwelzijn en de resultaten van het onderzoek niet te beïnvloeden. Om die reden stelt de CCD in dit kader een voorwaarde. Mede gelet op de wettelijke rol van de IvD beperkt deze voorwaarde de uitvoering van het project niet.

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).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


Ir. G. de Peijter
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, t.a.v. [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 december 2015 tot en met 1 december 2017, voor het project "Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat" met aanvraagnummer AVD103002015302, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Postdoc. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 november 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 november 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 november 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 2 november 2015, ontvangen op 2 november 2015.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 19 november 2015

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Breeding and Behavioural phenotyping and molecular correlates	Ratten (Rattus norvegicus) / BACHD transgenic rat om Sprague Dawley achtergrond; P1 tot 12 maanden; beide geslachten	215	Matig / moderate	

Voorwaarden

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

De IvD zal toezicht houden dat de acclimatisatie periode aan de omgedraaide dag/nacht ritme voldoende is om geen negatief effect op het dierenwelzijn en op de resultaten van de testen te hebben.

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 waar bij 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 delooptijd 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.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 16 december 2015 7:48
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Beschikking AVD103002015302
Bijlagen: DEC Advies 302.pdf; Beschikking AVD103002015302.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze brief is ook per post verstuurd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 17 december 2015 15:22
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling besluit aanvraag AVD103002015302

Geachte DEC leden,

Op 2 november heeft u advies uitgebracht op een aanvraag voor een projectvergunning met titel 'Phenotypic assessment of motor control, anxiety and social behavior in a transgenic rat model for Huntington's Disease' en aanvraagnummer AVD103002015302, uw kenmerk: 2015-0100. Wij danken u voor uw advies en we koppelen het besluit van de CCD graag terug.

Op 19 november 2015 heeft de aanvrager zijn aanvraag aangevuld. Hij heeft de vraag van de CCD over het geslacht van de proefdieren beantwoord. Hij heeft de aanvraag herzien na de vragen van de CCD en op 19 november een aangepaste versie van de projectaanvraag gestuurd, waarin het gebruik van beide geslachten opgenomen is.

Wij hebben ook u om aanvullende informatie gevraagd. Op 13 november 2015 heeft u gereageerd op onze vragen over het ongerief veroorzaakt door de individuele huisvesting in de Phenotyper.

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

De CCD stelt in aanvulling een algemene voorwaarde en een specifieke voorwaarde aan dit project. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld om te voldoen aan dat gene wat volgt uit dit artikel.

'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 waar bij 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 delooptijd 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.'

De specifieke voorwaarde betreft de acclimatisatie periode van de dieren aan de omgedraaide dag/nacht ritme. De CCD acht het noodzakelijk dat de acclimatisatie periode voldoende is om het dierenwelzijn en de resultaten van het onderzoek niet te beïnvloeden. Om die reden stelt de CCD in dit kader een voorwaarde. Mede gelet op de wettelijke rol van de IvD beperkt deze voorwaarde de uitvoering van het project niet.

'De IvD zal toezicht houden dat de acclimatisatie periode aan de omgedraaide dag/nacht ritme voldoende is om geen negatief effect op het dierenwelzijn en op de resultaten van de testen te hebben.'

De vergunning wordt afgegeven van 15 december 2015 tot en met 1 december 2017.

De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

We hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

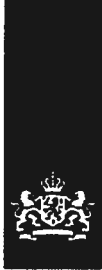
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

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
	NTS2015313								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x			x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				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	



16 NOV. 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 / 313
 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, t.a.v. [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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	Postdoctoraal onderzoeker	
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 2 _ 1 2 _ 2 0 1 5
- Einddatum 1 2 _ 1 2 _ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Wat is de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) in het ontstaan van acuut nierfal
- 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

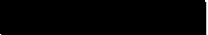
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven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

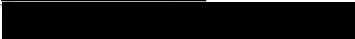
5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

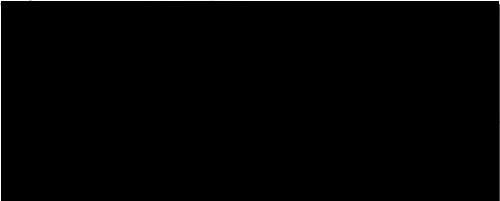
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende 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.

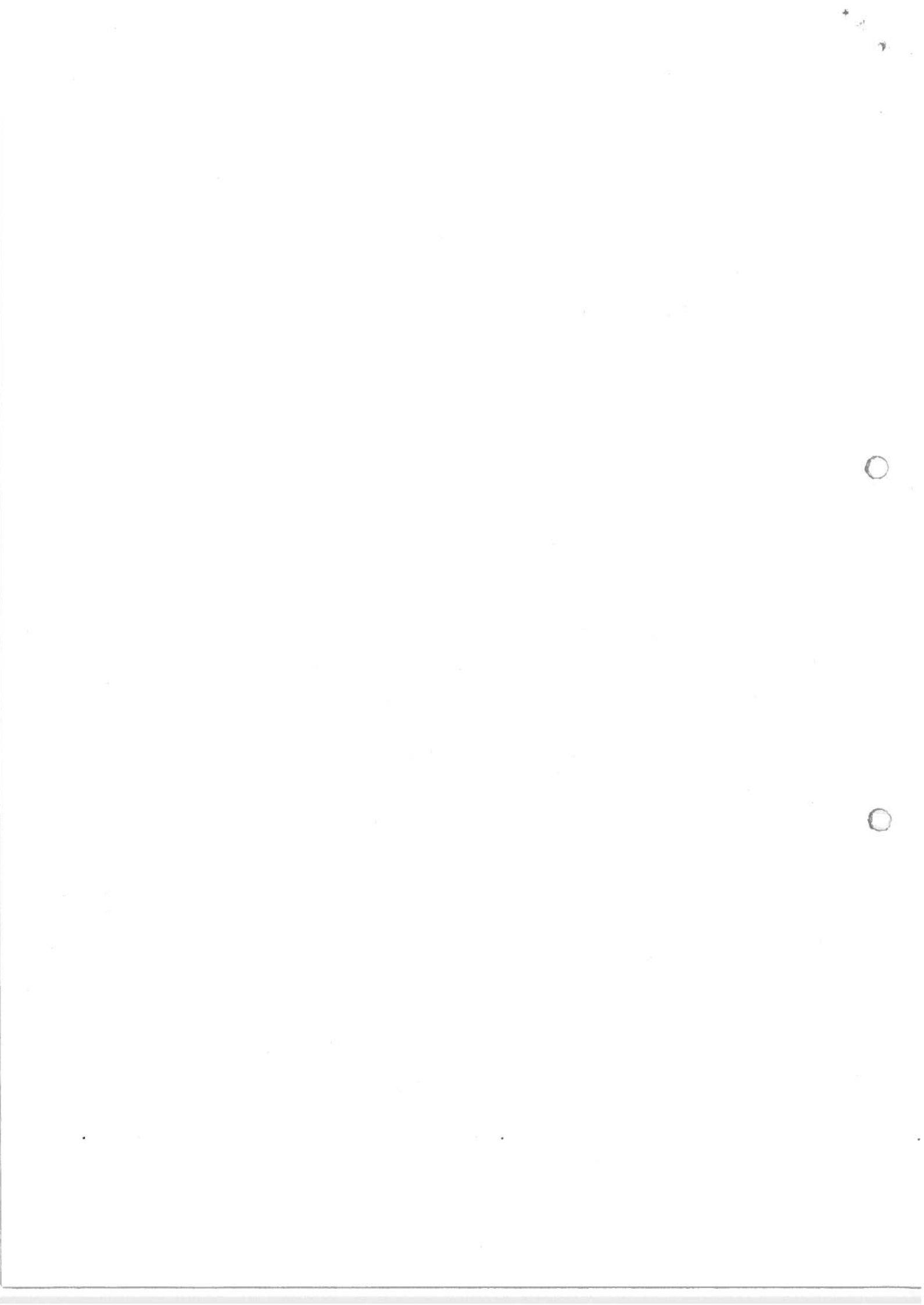
Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 13 - 11 - 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.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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen? |

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 or 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.

Acuut nierfalen (acute kidney injury; AKI) is een frequent optredend probleem in gehospitaliseerde patiënten, en is geassocieerd met een verhoogde kans op het ontwikkelen van chronisch nierfalen en tevens geassocieerd met sterftcijfers van >50% (Murugan R *et al.* Nat Rev Nephrol 2011; Thadhani R *et al.* NEJM 1996; Singbartl K *et al.* Kidney Int 2012). De belangrijkste oorzaak van het ontwikkelen van AKI is bloedvergiftiging (sepsis) (Bagshaw SM *et al.* Clin J Am Soc Nephrol 2007). Bloedvergiftiging (sepsis) is te karakteriseren als een zeer sterke systemische ontstekingsreactie gericht tegen een infectie (pathogeen), welke gepaard gaat met het ontwikkelen van diverse complicaties, waaronder AKI. AKI als complicatie van sepsis is geassocieerd met kort- en lange-termijn risico op overlijden (Bagshaw SM *et al.* NDT 2008). Momenteel zijn therapeutische mogelijkheden voor de behandeling en/of preventie van sepsis-gemedieerd AKI zeer gelimiteerd, en slechts van ondersteunende aard. Het is daarom van cruciaal belang om meer inzicht te krijgen in de moleculaire en cellulaire patho-fysiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontwikkelen van sepsis en sepsis-gemedieerd AKI, en therapeutische strategieën te ontwikkelen voor de behandeling van AKI in de septische patiënt.

Een van de primaire processen die optreedt tijdens sepsis(-gemedieerd AKI) is het ontwikkelen van heftige systemische en lokale nier ontstekingsprocessen (Bellomo R *et al.* Lancet 2012; Schrier RW *et al.* NEJM 2014; Chvojka J *et al.* Physiol Res 2010). **De focus van vele huidige klinische studies die ten doel hebben om sepsis te behandelen is dan ook gericht op het remmen van immuunactivatie (Savva A *et al.* Front Med 2013).** Het is bekend dat het aangeboren immuunsysteem een cruciale rol speelt in het opwekken van deze sterk overdreven immuunreacties (Leemans JC *et al.* Nat Rev Nephrol 2014; Gluba A *et al.* Nat Rev Nephrol 2010). Omdat een uit de hand gelopen immuunproces in de nier vervolgens leidt tot verergerende weefselschade en functiestoornissen is het cruciaal om meer inzicht te krijgen in de mechanismen waarmee ontstekingsreacties worden gereguleerd.

Het humaan cytokine Interleukine-37 (IL37) blijkt een krachtige remmende werking te hebben op de activatie van het aangeboren immuunsysteem. Daarnaast heeft IL37 ook een regulerende rol in de activatie van het adaptieve immuunsysteem (zoals activatie van dendritische cellen). In de mens komt IL37 in vele celtypen tot expressie, waaronder verschillende subtypen immuuncellen (zoals leukocyten en dendritische cellen) alsook in (nier) epitheliale cellen (Nold MF *et al.* Nat Imm 2010). **Basale endogene expressie van IL37 is laag, en wordt pas sterk opgereguleerd door inflammatoire stimuli (Bufler P *et al.* Biochem J. 2004; Imaeda H *et al.* Clin Exp Immunol 2013).** De ontstekingsremmende werking van IL37 verloopt zowel via intracellulaire cascades **die de transcriptie van proinflammatoire genen remmen** (door 'endogene' IL37 expressie), als via exogeen IL37 wanneer dit eiwit aanwezig is in het extracellulaire milieu **(Bulau AM *et al.* PNAS 2014). Extracellulair IL37 kan zijn**

ontstekingsremmende werking uitvoeren door binding aan de alfa-keten van de IL18-receptor (IL18R), in samenwerking met de co-receptor IL1R8, maar fungeert niet als een klassieke antagonist voor deze receptor (Nold-Petry CA *et al.* Nat Immunol 2015; Li S *et al.* PNAS 2015).

Aangezien er bij de muis geen homoloog van humaan IL37 bekend is, wordt voor de bestudering van de rol van IL37 *in vivo* gebruik gemaakt van een muis welke transgeen gemaakt is voor humaan IL37 (hIL37tg). Deze hIL37tg muis brengt humaan IL37 constitutief in alle lichaamscellen tot expressie, en vormt zo de basis voor het huidige en reeds verrichte onderzoek naar de effecten en werkingsmechanismen van IL37 (Nold MF *et al.* Nat Imm 2010). **Ondanks dat IL37 expressie gekoppeld is aan de constitutief actieve CMV-promoter in alle transgene cellen, is de basale transcriptie laag en vindt er opregulering plaats door inflammatoire stimuli (Nold *et al.* Nat Imm 2010). Hierdoor komt de kinetiek van IL37 expressie in deze hIL37tg muis overeen met de humane situatie. Ook voor exogeen toegediend IL37 eiwit is er in een muis een functioneel signaleringsmechanisme aanwezig (er is expressie van zowel IL18R en IL1R8 in de muis, waaraan IL37 bindt) (Nold-Petry CA *et al.* Nat Immunol 2015).**

Ook voor het exogeen IL37 is er in de hIL37tg muis een functioneel signaleringsmechanisme aanwezig (er is expressie van zowel IL18R en IL1R8 in de muis, waarop exogeen IL37 functioneert). In verschillende experimentele modellen met behulp van de hIL37tg muis is gebleken dat IL37 een zeer krachtige anti-inflammatoire en beschermende functie heeft in diverse ziekteprocessen, waaronder colitis (McNamee EN *et al.* PNAS 2011), obesitas (Ballak DB *et al.* Nat Commun 2014), myocardiaal infarct (Wu B *et al.* Clin Exp Immunol 2014) en nier ischemie/reperfusie schade (Yang Y *et al.* Kidney Int 2014). Tevens is **met behulp van de hIL37tg muis** beschreven dat IL37 expressie een beschermende werking heeft tegen het optreden van LPS-geïnduceerde septische shock, welke leidt tot een sterke reductie van de systemische spiegels van diverse pro-inflammatoire cytokines en verminderde leverfunctiestoornissen (Nold MF *et al.* Nat Imm 2010). In deze studie is echter niet gekeken naar de effecten van IL37 expressie op de lokale pathofysiologische consequenties van sepsis in de nier, en ook niet naar de effecten van IL37 op LPS-geïnduceerd AKI.

afkomstig van experimenten met primaire cellen () suggereren bovendien dat de aanwezigheid van zowel endogene IL37 expressie alsook exogene IL37 eiwit toediening een remmende werking geeft op de inflammatoire response van zowel immuuncellen alsook van nier epitheelcellen *in vitro*. Het is tot op heden echter onbekend wat de functionele contributie is van IL37 expressie in de onderliggende mechanismen van sepsis-gemedieerde AKI *in vivo*. Tevens is het nog onbekend of de toediening van exogeen IL37 eiwit mogelijk bescherming kan bieden tegen het ontwikkelen van sepsis-gemedieerd AKI. In deze studie willen we de therapeutische potentie van toegediend IL37 eiwit daarom vergelijken met de effecten van een ander component, welke reeds in experimentele studies een beschermend effect heeft laten zien tijdens sepsis-gemedieerd AKI. Uit verschillende experimentele dierstudies blijkt namelijk dat erythropoietin (EPO) een functionele bescherming biedt tegen het ontwikkelen van AKI tijdens sepsis (Coldewey SM *et al.* Kidney Int 2013; Aoshiba K *et al.* Crit Care Med 2009; Mitra A *et al.* NDT 2007).

De hypothese die wij in ons project hanteren is dat IL37 expressie een remmende en beschermende werking heeft op respectievelijk de ontstekingsprocessen en (nier)functiestoornissen die zich afspelen na het ontstaan van sepsis(-gemedieerd) AKI.

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?

Hoofddoelstelling: Het bestuderen van de functionele contributie en de therapeutische potentie van het ontstekingsremmend eiwit IL37 in sepsis-gemedieerd AKI.

Doelstelling Deelexperiment A: Het doel van de beschreven studie is het onderzoeken van de functionele contributie van IL37 expressie in de onderliggende mechanismen van sepsis-gemedieerd AKI.

Doelstelling Deelexperiment B: Hierin willen we de therapeutische potentie van exogene IL37 toediening bestuderen tijdens sepsis-gemedieerd AKI, en deze effecten vergelijken ten opzichte van de beschermende werking van het eiwit erythropoietine (EPO). Deze component is in eerdere studies al aangetoond als beschermende factor tijdens sepsis-gemedieerde AKI (zie 3.1), en fungeert zodoende als positieve controle.

Voor de uitvoering van beide beschreven deelexperimenten is alle benodigde expertise en infrastructuur aanwezig op de afdeling [REDACTED]. Tevens worden de experimenten uitgevoerd in [REDACTED], waar alleen bevoegd en gecertificeerd personeel betrokken is bij de uitvoer van de betreffende handelingen. De gekozen proefopstelling is zodoende uitvoerbaar binnen de voorgenomen kaders.

3.3 Relevance

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

Acuut nierfalen is een frequent optredend probleem in gehospitaliseerde patiënten, en is geassocieerd met een verhoogde kans op het ontwikkelen van chronisch nierfalen en tevens geassocieerd met sterftcijfers van >50% (Murugan R *et al.* Nat Rev Nephrol 2011; Thadhani R *et al.* NEJM 1996; Singbartl K *et al.* Kidney Int 2012). De belangrijkste oorzaak van het ontwikkelen van AKI is sepsis (Bagshaw SM *et al.* Clin J Am Soc Nephrol 2007). AKI als complicatie van sepsis is geassocieerd met kort- en lange-termijn risico op overlijden (Bagshaw SM *et al.* NDT 2008). Het ontwikkelen van AKI tijdens sepsis verhoogt de mortaliteit, morbiditeit, en zorgt voor een verlengde opname duur op de ICU, gepaard gaande met sterk oplopende zorgkosten.

Ondanks veel onderzoek dat is verricht naar de mogelijke onderliggende mechanismen van het ontstaan van sepsis en sepsis-gemedieerd AKI, is de huidige behandeling slechts van ondersteunende aard, en zijn er nog geen therapeutische strategieën ontwikkeld welke tot de kliniek zijn doorgedrongen. Meer kennis is benodigd over de onderliggende mechanismen welke ten grondslag liggen aan de verstoorde immunologische reacties tijdens sepsis-gemedieerde AKI. Verbeterd inzicht in de rol van IL37 hierin opent mogelijkheden om AKI beter te behandelen.

3.4 Research Strategy

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

Dit project bestaat uit 2 hoofdlijnen:

Deelproject A: (beschrijvende studie): Het bestuderen van de functionele contributie van IL37 in "sepsis-gemedieerd AKI":

Om de exacte rol van endogene IL37 expressie in de pathofysiologie van sepsis-gemedieerde AKI te onderzoeken worden zowel wild type alsook hIL37tg muizen onderworpen aan een experimenteel model van "sepsis-gemedieerd AKI", door middel van een eenmalige sublethale intraperitoneale LPS injectie. Dit is in de literatuur het meest gangbare en gestandaardiseerde model wat wordt gebruikt om sepsis en daaropvolgend AKI te induceren. Tevens is de hIL37tg muis de enige muisoort die IL37 eiwit tot expressie brengt, en derhalve bruikbaar is om de rol van endogeen IL37 expressie te onderzoeken. Door het ziektebeloop en de onderliggende cellulaire en moleculaire processen in zowel nierweefsel alsook systemisch te bestuderen, en de resultaten tussen deze twee experimentele groepen met elkaar te vergelijken, kunnen we de functionele contributie van endogene IL37 expressie op verschillende tijdstippen van het ziektebeloop bestuderen.

Deelproject B: (Interventie studie): Het bestuderen van de therapeutische potentie van exogene IL37 toediening tijdens "sepsis-gemedieerde AKI":

Om te bestuderen wat het therapeutische effect is van additioneel exogeen IL37 eiwit tijdens sepsis-gemedieerd AKI, en dit effect te vergelijken ten opzichte van een positieve controle (de therapeutische potentie van erythropoietine (EPO)), worden wild type muizen onderworpen aan een experimenteel model van "sepsis-gemedieerd AKI". Dit wordt uitgevoerd door middel van een eenmalige sublethale intraperitoneale LPS injectie, welke in de literatuur het meest gangbare en gestandaardiseerde model is om sepsis en daaropvolgend AKI te ontwikkelen. Muizen zullen daarna worden geïnjecteerd met exogeen recombinant IL37 eiwit, EPO, of vehicle als negatieve controle. De muizen worden op verschillende tijdstippen geofferd, om zodoende de werking van het toegediende IL37 en EPO te kunnen bestuderen in zowel bloed alsook lokale cellulaire en moleculaire processen in de nieren. De effecten van IL37 kunnen worden vergeleken met de resultaten behaald uit de groep muizen welke EPO kregen toegediend, om zodoende de mate van het effect te kunnen bepalen. De dosis van het toegediende IL37 eiwit en EPO worden bepaald aan de hand van studies beschreven in de literatuur.

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.

In dit project wordt gestart met deelexperiment A (type 1 dierproef), waarin we de rol van endogene IL37 expressie in sepsis-gemedieerd AKI bestuderen. Met behulp van het bepalen van verschillende experimentele parameters (waaronder systemische cytokine/chemokine levels en leverfunctiewaarden) kunnen we tevens de reeds beschreven rol van IL37 in sepsis bevestigen (Nold MF *et al.* Nat Imm 2010).

Dit wordt gevolgd door deelexperiment B, welke dient om de therapeutische potentie van IL37 toediening te bestuderen en te vergelijken ten opzichte van de therapeutische potentie van een reeds beschreven component, EPO (interventie studie).

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

Er zal worden begonnen met het uitvoeren van de experiment A, gevolgd door de experiment B. De resultaten uit de experiment A zullen niet de opzet van de experiment B beïnvloeden, aangezien in beide experimenten naar verschillende vormen van IL37 eiwit gekeken wordt (in de experiment A kijken we naar de rol van endogeen IL37 expressie; in de experiment B kijken we naar het effect van toegediend exogeen IL37 eiwit). **Uit een recente studie is gebleken dat endogene IL37 expressie een beschermend effect geeft op het ontwikkelen van sepsis (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Hierdoor is naar onze verwachting de experiment A optimaal om de werking van endogeen IL37 in het ontstaan van AKI als gevolg van sepsis te bestuderen. Extracellulair IL37 kan additieve effecten hebben bovenop de rol van endogeen IL37. Dit blijkt uit het feit dat het voorbehandelen van hIL37g muizen met IL37-blokkerende antilichamen een geneutraliseerd effect geeft na LPS toediening (Bulau AM et al. PNAS 2014).**

Het uitblijven van een eventueel therapeutisch effect van exogene IL37 toediening in de experiment B hoeft dus ook niet te betekenen dat er geen functie en/of rol is voor endogene IL37 expressie in het ontstaan van acuut nierfalen tijdens sepsis (de experiment A). Wanneer er wel een effect gevonden wordt van endogene IL37 expressie (doel van de experiment A) kan dit namelijk aanleiding geven tot vervolgstudies waarin getracht wordt om het endogene expressie niveau van IL37 te moduleren, om zodoende bescherming te bieden tegen sepsis-gemedieerd AKI. Naar ons idee hoeven de resultaten van beide experimenten elkaar dus niet te blokkeren.

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	Deelexp. A: Het bestuderen van de functionele contributie van IL37 in sepsis-gemedieerd AKI
2	Deelexp. B: Het bestuderen van de therapeutische potentie van exogene IL37 toediening gedurende sepsis-gemedieerd AKI

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Deelexp. A: Het bestuderen van de functionele contributie van IL37 in sepsis-gemedieerd AKI

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.

Twee verschillende groepen muizen worden gebruikt: (a) C57BL/6J wild type () en (b) hIL37tg muizen (). In de experimenten worden alle groepen aan elkaar gematched aan de hand van geslacht (man) en leeftijd (8-12 weken oud) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

Ter inductie van sepsis ontvangen groepen WT en hIL37tg muizen een eenmalige intraperitoneale injectie van 10mg/kg LPS (component van de celwand van bacterien). Het ziektebeloop van de muizen en het ontstaan van AKI wordt vervolgens gemonitord. Groepen muizen worden geofferd op verschillende tijdstippen (2uur; 4uur; 24uur; 48uur) na de LPS injectie. Deze tijdstippen worden gekozen om zodoende de effecten van IL37 expressie in de acute inflammatoire processen (2uur en 4uur, voor bepalen van veranderingen in mRNA expressie niveaus), alsook de rol van IL37 expressie op latere momenten (24uur, 48uur, voor bepaling effecten op functioneel niveau) te onderzoeken. Als controle groep ontvangen een groep WT en hIL37tg muizen een eenmalige intraperitoneale injectie van vehicle (saline), waarna deze muizen op een eenmalig tijdstip worden geofferd (4uur). Deze groepen geven ons de basaal-waarden van allerlei te onderzoeken parameters (zie onder), en hierin wordt geen verschil tussen WT en hIL37tg muizen verwacht.

Alle muizen worden geofferd door cervicale dislocatie onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nieren, lever en miltweefsel worden uitgenomen, en direct opgedeeld in delen welke formaline-gefixeerd worden of in de vloeibare stikstof worden opgeslagen. Bloed wordt opgevangen in EDTA-anticoagulant-gecoated tubes, waarna plasma wordt geïsoleerd. In het geïsoleerde lever en miltweefsel kunnen we bestuderen of we de in de literatuur bevonden rol van IL37 expressie tijdens sepsis kunnen bevestigen.

De uitleesparameters zijn:

- plasma ureum en creatinine waarden als maat van nierfunctiestoornissen, plasma ASAT en ALAT concentraties als maat van leverfunctiestoornissen
- plasma cytokine/chemokine waarden, als maat van systemische ontstekingsniveau.
- locale nier cytokine/chemokine concentraties, als maat van lokale nierontstekingsniveau
- nier histopathologie en lokale mRNA expressiewaarden van tubulaire schademarkers (NGAL en KIM-1), als maat voor nierschade.
- nier mRNA expressie waarden van ontstekingsparameters, als maat van lokale ontstekingsreacties.
- milt en lever mRNA expressie waarden van ontstekingsparameters, als maat van lokale ontstekingsreacties ter bevestiging van de bevonden effecten in de literatuur.

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

1. Eenmalige intraperitoneale injectie van 10mg/kg LPS of vehicle (saline). Dit is in de literatuur het meest gangbare en gestandaardiseerde model om sepsis en daaropvolgend AKI te induceren. De dosis is gekozen aan de hand van studies in de literatuur welke dezelfde dosis gebruiken in modellen van sublethale sepsis met behulp van zelfde C57BL/6J muizen.
2. Offeren op verschillende tijdstippen onder volledige anesthesie.

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

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, zal worden berekend door middel van een poweranalyse. Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van het functionele beschermende effect van IL37 tijdens sepsis-gemedieerd AKI, gebruiken we de plasma ureum waarden. We stellen tenminste 50% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de functie van IL37.

Op dit moment maken we met een schatting gebruik van maximaal $n=15$ muizen benodigd per groep. In totaal gebruiken we 2 stammen x 5 tijdstippen (vehicle 4uur, LPS 2u, LPS 4u, LPS 24u, LPS 48u) x ($n=15$ /groep) = 150 muizen (75x WT; 75x hIL37tg).

B. The animals

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

In deze studie gebruiken we wild type C57BL/6J muizen als controle en de hIL37tg muisstam, welke humaan IL37 constitutief tot expressie brengt. Dit is de enige muisstam welke IL37 constitutief tot expressie brengt, en vormt zodoende een unieke tool om de functionele bijdrage van IL37 in een experimenteel model van sepsis-gemedieerd AKI te bestuderen. De achtergrond van deze muis is een C57BL/6J, zodat deze stam fungeert als referentie.

In eerdere studies is telkens gebruik gemaakt van mannelijke muizen, ten einde de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerde AKI **uit te sluiten. Verschillende studies laten namelijk zien dat er sexeverschillen zijn in de immunologische respons tijdens het ontwikkelen van sepsis, als gevolg van verschillende functies van androgenen en oestrogenen (Angele MK *et al.* Virulence 2014; Marriott I *et al.* Immunologic Research 2006; Marriott I *et al.* Journal of Reproductive Immunology 2006; Aoyama M *et al.* Shock 2009). Aangezien wij in dit project juist een eiwit willen bestuderen dat een specifieke rol heeft in de immunologische reacties, zou het gebruik van vrouwelijke muizen of een mix van m/v muizen inderdaad kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameters, waardoor een hogere n aan muizen benodigd zou zijn. Hoe groot dit effect zou zijn kunnen wij niet goed inschatten. Bij een positief resultaat van het onderzoek zouden we kunnen overwegen de experimenten te herhalen met vrouwelijke muizen om de generaliseerbaarheid van de effecten te bestuderen.**

De gevoeligheid van muizen voor sepsis wordt o.a. bepaald door de leeftijd; hoe ouder de muis hoe gevoeliger deze is voor het ziektebeloop. Wij kiezen voor de meest gangbare leeftijd welke in eerdere studies is gebruikt voor de leeftijd (8-12 weken). Deze leeftijdscategorie in combinatie met de gekozen dosis van de LPS injectie wordt in vele studies toegepast. Door dezelfde condities aan te houden beogen we de spreiding in uitleesparameters en gevoeligheid voor het experimenteel model te minimaliseren, welke het totale aantal muizen per groep vermindert.

Schatting totaal te gebruiken dieren per stam:

-C57BL/6J: n=75

-hIL37tg: n=75

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mus musculus, C57BL/6J wild type		75	8-12 weken
mus musculus; hIL37tg		75	8-12 weken

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:

Voordat we beginnen aan deze dierstudies is onze hypothese al getest in geïsoleerde celsystemen met behulp van primaire cellen afkomstig van de hIL37tg muis, welke zijn blootgesteld aan LPS. Endogene IL37 expressie blijkt een remmende werking te hebben op de ontstekingsreacties van deze cellen. Echter, omdat sepsis-gemedieerd AKI een zeer complex proces is waarbij meerdere orgaansystemen betrokken zijn, is het onmogelijk om alle

benodigde experimenten uit te voeren in deze *in vitro* systemen. Daarom is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen ter bestudering van dit ziektebeeld.

Verfijning:

Tijdens deze experimenten gebruiken we muizen, waaronder de hIL37tg muisstam welke IL37 constitutief tot expressie brengt. Deze stam is de enige, en daarmee ook de beste tool die momenteel beschikbaar is om de rol van IL37 in experimentele modellen *in vivo* te kunnen onderzoeken. Het gebruik van 'lagere' diersoorten waarin IL37 tot expressie komt, is dan ook niet mogelijk om de effecten van sepsis-gemedieerd AKI na te bootsen. Daarnaast is dit model van LPS-induced sepsis in de muis een veelvuldig gebruikt en gestandaardiseerd experimenteel model in de wetenschappelijke literatuur. Er wordt gekozen voor een sublethale dosis (aan de hand van de literatuur), waardoor geen bovenmatige uitval verwacht wordt.

Vermindering:

Voordat het dierexperiment aanvangt is allereerst berekend hoeveel dieren we minimaal nodig hebben per groep om zekerheid te krijgen over de resultaten die voortvloeien uit een experiment (poweranalyse). Dit minimum aantal dieren zal dan worden geïncludeerd. Het is essentieel om de rol van IL37 expressie in zowel de acute alsook latere fase van sepsis-gemedieerd AKI te onderzoeken, aangezien op verschillende tijdstippen verschillende effecten belangrijk zijn. In de vroegere fase zal met name de ontstekingsreactie worden opgewekt, zodat we daar de rol van IL37 expressie in kunnen bestuderen. Op latere momenten kunnen we juist de effecten van IL37 expressie op functioneel niveau bestuderen, zoals orgaanfuncties en de mate van ontstekingsreacties. Als controle groep kiezen we voor de inclusie van slechts één tijdstip van offeren (4 uur na injectie) in plaats controle groepen op alle tijdstippen mee te nemen.

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

Na het induceren van sepsis(-gemedieerd AKI) door middel van LPS injectie kan de muis een sterk ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: **daling van de lichaamstemperatuur**, verminderde eetlust/drinken, verminderde activiteit, uitdroging, gewichtsafname). Ter verlichting van het ongerief **zullen de kooien deels op warmtematjes worden geplaatst, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven.** Tevens krijgen de muizen extra kooiverrijking en papvoer aangeboden. Daarnaast worden drinkflessen met langere spuit gebruikt waardoor muizen minder ver hoeven te reiken om te drinken, ter vermindering van de uitdroging. De gebruikte sublethale dosis LPS is afgeleid van studies uit de literatuur, en tevens worden de voorgestelde tijdstippen waarop de muizen worden geofferd ook in andere studies gebruikt om zodoende verschillende typen uitleesparameters te onderzoeken (acute fase, latere functionele fase). De muizen worden zeer frequent gemonitord op deze algehele verschijnselen door de onderzoekers in samenwerking met de [REDACTED] en [REDACTED]. De muizen worden niet langer in studie gehouden dan nodig is aan de hand van het eventueel bereiken van het humaan eindpunt. Het includeren van de latere tijdstippen (24uur en 48uur) is noodzakelijk om de rol van IL37 expressie te kunnen bestuderen op functioneel niveau en daaropvolgende recovery.

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.

No

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Als gevolg van de experimentele handeling (LPS injectie) ontwikkelen de muizen sepsis met daaropvolgend acuut nierfalen. Hierdoor wordt een sterke mate van aantasting van het welzijn veroorzaakt.

De lichamelijke activiteit zal sterk verminderd worden, in combinatie met **een daling van de lichaamstemperatuur**, verminderde hydratatie, verminderde eetlust en gewichtsafname. Naargelang de muizen langer in studie zitten, zullen de bovengenoemde effecten sterker zijn.

Er wordt gekozen voor een sublethale dosis van LPS (10mg/kg), gebaseerd op andere studies in de literatuur. Dit houdt in dat, ondanks de hoge mate van ongerief, de muizen hieraan niet direct overlijden. Wij zijn met name geïnteresseerd in de rol van IL37 in de vroegere fasen van het ziekteproces (eerste 48 uur na het induceren van sepsis), waardoor de muizen hooguit 48 uur in het experiment zullen zitten.

Explain why these effects may emerge.

De intraperitoneale injectie van LPS zorgt voor het ontwikkelen van sepsis. De klinische effecten als gevolg hiervan zorgen voor een mate van ernstig ongerief.

Pijnbestrijding (zoals buprenorphine of carprofen) ter verlichting van pijn is in dit model niet zinvol, aangezien de muizen geen fysieke pijn lijden als gevolg van een ingreep, maar wel doodziek zijn als gevolg van de ontwikkelde sepsis. Tevens willen wij de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) bestuderen; het gebruik van NSAID's (anti-inflammatoir middel) zou dus al zelf een effect hebben op de ontstane ontstekingsreacties, en zodoende de mogelijke effecten van IL37 kunnen beïnvloeden.

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

Ter verlichting van het ongerief zal voer worden aangeboden in de kooi (papvoer) in plaats van in de ruif. Tevens zal gebruik gemaakt worden van drinkflessen met een extra lange tuit, zodat de muizen zich minder ver hoeven te strekken om te kunnen drinken. **De kooien worden voor een deel geplaatst op warmtematjes, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven om zo hun lichaamstemperatuur op peil te houden.**

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.

De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

-de muizen ondergaan extra ongerief als gevolg van condities die niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma)

-gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.

-te hoge totaal score (5 of hoger) voor kenmerken van algeheel ongerief: uitdroging, activiteit, vachtstructuur. Deze parameters zullen worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren (elke parameter individueel gescoord op schaal van 0-2).

-betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment.

-de muizen ondergaan meer ongerief dan verantwoord kan worden voor de doelstelling van het beschreven project, en welke door de DEC is gewogen in de huidige projectaanvraag.

Wanneer het humaan eindpunt is bereikt, zal een muis actief uit de studie worden genomen door middel van euthanasie. Daarnaast blijven de muizen maximaal 48 uur in het experiment.

Indicate the likely incidence.

Naarmate de muizen langer in studie zitten (24uur/48uur) kan de incidentie van het humaan eindpunt groter worden in wild type muizen ten opzichte van de vroegere tijdstippen. Er wordt echter een sublethale dosis LPS gebruikt, waardoor de muizen hier niet aan hoeven te overlijden. Zoals bekend uit de literatuur (Nold M *et al.* Nat Imm 2010) tonen hIL37tg muizen tekenen van bescherming tegen de effecten van sepsis-gemedieerde shock. Onze hypothese stelt dat hIL37tg muizen ook functioneel beschermd zijn tegen het ontwikkelen van sepsis-gemedieerde AKI. De incidentie van humaan eindpunt in deze experimentele groep zal daarom naar onze verwachting lager zijn ten opzichte van de controle groep (wild type muizen).

De verwachte incidentie in WT muizen is 5-10%; de verwachte incidentie in de hIL37tg muizen is 0-5%.

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).

De mate van ongerief in de experimentele groepen welke LPS injecties krijgen is ingeschat als ernstig. Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien deze het gevolg is van het induceren van sepsis door middel van LPS injecties.

Aan de hand van de hypothese wordt in de hIL37tg muisgroep (**40%**) een matig niveau van ongerief verwacht ten opzichte van de wild type controle muizen (**ernstig; 40%**).

De mate van ongerief in de controle groepen wordt ingeschat als mild (**20%**), aangezien deze muizen geen sepsis zullen ontwikkelen.

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.

De groepen muizen zullen actief worden geofferd op verschillende tijdstippen na de initiële injectie van LPS, ten einde om organen en bloed te kunnen isoleren.

Hierin kunnen we belangrijke serologische, histologische en biochemische parameters bestuderen welke essentieel zijn voor het bestuderen van de rol van IL37 in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Deelexp. B: Het bestuderen van de therapeutische potentie van exogene IL37 toediening gedurende sepsis-gemedieerd AKI

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 dit deelproject worden alleen C57BL/6J wild type muizen gebruikt. Alle interventiegroepen worden aan elkaar gematched aan de hand van geslacht (man) en leeftijd (8-12 weken oud) (voor motivatie geslacht/leeftijd, zie B).

Ter inductie van sepsis en daaropvolgend acuut nierfalen (AKI) ontvangen groepen WT muizen een eenmalige sublethale intraperitoneale injectie van 10mg/kg LPS ofwel vehicle (saline) als controle. Daarna ontvangen groepen WT muizen een dosis van ofwel vehicle, recombinant IL37 eiwit, ofwel erythropoietin (EPO). De benodigde dosis van recombinant IL37 eiwit en EPO wordt bepaald aan de hand van studies uit de literatuur welke al beschermende effecten van deze componenten (in andere modellen) hebben laten zien. Hierdoor zijn er uiteindelijk de volgende deelgroepen:

groep 1-1: vehicle + saline

groep 1-2: vehicle + recombinant IL37

groep 1-3: vehicle + EPO

groep 2-1: LPS + saline

groep 2-2: LPS + recombinant IL37

groep 2-3: LPS + EPO

Het ziektebeloop van de muizen wordt vervolgens gemonitord, en vervolgens worden groepen muizen geofferd op verschillende tijdstippen (24uur; 48uur) na de primaire LPS injectie om de therapeutische potentie te onderzoeken. Om de therapeutische effecten van recombinant IL37 (en EPO) te onderzoeken, gebruiken we deze tijdstippen aangezien hierop het effect van deze componenten op het ontstaan van sepsis-geïnduceerd orgaanfalen het grootst is. Op vroegere tijdstippen (zoals 2uur/4uur) verwachten we nog geen effecten te kunnen gaan zien op parameters welke orgaanfalen demonstreren.

Alle muizen worden geofferd door middel van cervicale dislocatie, waarna bloed, nieren, lever en miltweefsel worden uitgenomen, en direct opgedeeld in delen welke formaline-gefixeerd worden of in de vloeibare stikstof worden opgeslagen. Bloed wordt opgevangen in EDTA-anticoagulant-gecoated tubes, waarna plasma wordt geïsoleerd. In het geïsoleerde lever en miltweefsel kunnen we bestuderen of we de in de literatuur bevonden effecten van LPS-geïnduceerde sepsis kunnen reproduceren.

Primaire uitleesparameters zijn:

- plasma ureum en creatinine waarden als maat van nierfunctiestoornissen, plasma ASAT en ALAT concentraties als maat van leverfunctiestoornissen.
- plasma cytokine/chemokine waarden als maat van systemische ontstekingsniveau
- locale nier cytokine/chemokine concentraties als maat van lokale nierontstekingsniveau
- nier histopathologie en lokale mRNA expressiewaarden van tubulaire schademarkers (NGAL en KIM-1) als maat van nierschade.
- nier mRNA expressie waarden van ontstekingsmarkers, als maat van lokale ontstekingsniveau
- lever en milt mRNA expressie waarden van ontstekingsparameters, als maat van lokale ontstekingsreacties

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

-
1. Eenmalige intraperitoneale injectie van 10mg/kg LPS of saline
 2. Eenmalige subcutane injectie van (a) saline, (b) recombinant IL37 eiwit, (c) recombinant humaan EPO

De toegediende doses zijn bepaald aan de hand van beschreven studies in de literatuur, welke een beschermend effect hebben laten zien van EPO tijdens sepsis-gemedieerd AKI, en studies welke een ontstekingsremmend effect hebben laten zien voor recombinant IL37 eiwit. De toedieningswijze (subcutaan) is gekozen aan de hand van de literatuur, waarin eerder is beschreven dat EPO welke subcutaan werd toegediend een beschermend effect teweeg bracht.

3. Offeren op verschillende tijdstippen onder volledige anesthesie

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

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, zal worden berekend door middel van een poweranalyse. Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van het functionele beschermende effect van IL37 tijdens sepsis-gemedieerd AKI, gebruiken we de plasma ureum waarden. We stellen tenminste 50% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de functie van recombinant IL37. De groepen muizen welke EPO toediening krijgen, fungeren als positieve controle; het is daarom niet nodig een verschil tussen de EPO en recombinant IL37 behandelde groepen te vinden.

Op dit moment maken we met een schatting gebruik van maximaal $n=15$ muizen benodigd per groep **na LPS injectie. Voor de controle groepen welke geen sepsis ontwikkelen maken we een schatting dat we maximaal $n=10$ muizen benodigd hebben per groep.**

In totaal gebruiken we 1 muisstam x 3 subgroepen x ($n=15$ /groep) + **3 subgroepen x ($n=10$ /groep) = 75 muizen (75x WT).**

B. The animals

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

Voor deze setting gebruiken we alleen C57B/6J wild type muizen.

In eerdere studies is telkens gebruik gemaakt van mannelijke muizen, ten einde de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerd AKI **uit te sluiten. Verschillende studies laten namelijk zien dat er sexe-verschillen zijn in de immunologische response tijdens het ontwikkelen van sepsis, als gevolg van verschillende functies van androgenen en oestrogenen (Angele MK *et al.* Virulence 2014; Marriott I *et al.* Immunologic Research 2006; Marriott I *et al.* Journal of Reproductive Immunology 2006; Aoyama M *et al.* Shock 2009). Aangezien wij in dit project juist een eiwit willen bestuderen dat een specifieke rol heeft in de immunologische reacties, zou het gebruik van vrouwelijke muizen, of een mix van m/v muizen inderdaad kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameters, waardoor een hogere n aan muizen benodigd zou zijn. Hoe groot dit effect zou zijn kunnen**

we niet goed inschatten. Wij kiezen er daarom ook voor om alleen mannelijke muizen te gebruiken. **Bij een positief resultaat van het onderzoek zouden we kunnen overwegen de experimenten te herhalen met vrouwelijke muizen om de generaliseerbaarheid van de effecten te bestuderen.**

De gevoeligheid van muizen voor sepsis wordt o.a. bepaald door de leeftijd; hoe ouder de muis hoe gevoeliger deze is voor het ziektebeloop. Wij kiezen voor de meest gangbare leeftijd welke in eerdere studies is gebruikt voor de leeftijd (8-12 weken). Deze leeftijdscategorie in combinatie met de gekozen dosis van de LPS injectie wordt in vele studies toegepast. Door dezelfde condities aan te houden beogen we de spreiding in de uitleesparameters en gevoeligheid voor het experimenteel model te minimaliseren, welke het totale aantal muizen per groep vermindert.

Schatting totaal te gebruiken dieren per stam:

-C57Bl/6J: **n=75**

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mus musculus, C57BL/6J		75	8-12 weken

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:

Voordat we beginnen aan deze dierstudies is onze hypothese al getest in geïsoleerde celsystemen met behulp van primaire cellen (immuuncellen en nier epitheelcellen) welke zijn blootgesteld aan LPS, en additioneel gestimuleerd werden met recombinant IL37 eiwit. Hieruit bleek dat het toegediende exogene IL37 eiwit een remmende werking heeft op de ontstekingsreacties die werd opgewekt door LPS in deze cellen. Echter, omdat sepsis-gemedieerd AKI een zeer complex proces is waarbij meerdere orgaansystemen betrokken zijn, is het onmogelijk om alle benodigde experimenten uit te voeren in deze systemen. Daarom is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen. Om de mogelijke potentie van het toegediende recombinant IL37 te vergelijken ten opzichte van andere, reeds beschreven beschermende componenten (EPO), vergelijken we de therapeutische effecten ten opzichte van een groep muizen welke EPO toegediend heeft gekregen.

Verfijning:

Tijdens deze experimenten gebruiken we muizen. Deze diersoort is in de literatuur al veelvuldig gebruikt waarin is gedemonstreerd dat het toedienen van exogeen IL37 eiwit een therapeutisch effect en ontstekingsremmende werking heeft *in vivo*. Voor 'lagere' diersoorten is dat onbekend, en is het niet mogelijk om zelfde modellen voor het ontwikkelen van sepsis-gemedieerd AKI te onderzoeken. Daarnaast is dit model van LPS-induced sepsis in de muis een veelvuldig gebruikt en gestandaardiseerd experimenteel model in de wetenschappelijke literatuur. Er wordt gekozen voor een sublethale dosis (aan de hand van de literatuur), waardoor geen bovenmatige uitval verwacht wordt.

Vermindering:

Voordat het dierexperiment aanvangt is allereerst berekend hoeveel dieren we minimaal nodig hebben per groep om zekerheid te krijgen over de resultaten die voortvloeien uit een experiment (poweranalyse). Dit minimum aantal dieren zal dan worden geïncludeerd. Aangezien we geen therapeutische effecten verwachten te kunnen bestuderen in een vroege fase, kiezen we alleen voor de inclusie van groepen muizen welke geofferd worden op tijdstippen waarop functionele effecten meetbaar zijn (24uur/48uur).

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

Na het induceren van sepsis(-gemedieerd AKI) door middel van LPS injectie kan de muis een sterk ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: **daling van de lichaamstemperatuur**, verminderde eetlust/drinken, verminderde activiteit, uitdroging, gewichtsafname). **Ter verlichting van het ongerief zullen de kooien deels op warmtematjes worden geplaatst, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven.** Tevens krijgen de muizen extra kooiverrijking en papvoer aangeboden. Daarnaast worden drinkflessen met langere tuit gebruikt waardoor muizen minder ver hoeven te reiken om te drinken, ter vermindering van de uitdroging. De gebruikte sublethale dosis LPS is afgeleid aan de hand van studies uit de literatuur, en tevens worden de voorgestelde tijdstippen waarop de muizen worden geofferd ook in andere studies gebruikt om zodoende functionele effecten te kunnen bestuderen.

De muizen worden zeer frequent gemonitord op deze algehele verschijnselen door de onderzoekers in samenwerking met de [REDACTED] en [REDACTED]. De muizen worden niet langer in studie gehouden dan nodig is aan de hand van het eventueel bereiken van het humaan eindpunt.

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.

No

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Als gevolg van de experimentele handeling (LPS injectie) ontwikkelen de muizen sepsis met daaropvolgend acuut nierfalen. Hierdoor wordt een sterke mate van aantasting van het welzijn veroorzaakt.

De lichamelijke activiteit zal sterk verminderd worden, in combinatie **met een daling van de lichaamstemperatuur**, verminderde hydratatie, verminderde eetlust en gewichtsafname. Naargelang de muizen langer in studie zitten, zullen de bovengenoemde effecten sterker zijn.

Er wordt gekozen voor een sublethale dosis van LPS (10mg/kg), gebaseerd op andere studies in de literatuur. Dit houdt in dat, ondanks de hoge mate van ongerief, de muizen hieraan niet direct overlijden. Wij zijn met name geïnteresseerd in de rol van IL37 in de vroegere fasen van het ziekteproces (eerste 48 uur na het ontstaan van sepsis), waardoor de muizen hooguit 48 uur in het experiment zullen zitten.

Explain why these effects may emerge.

De intraperitoneale injectie van LPS zorgt voor het ontwikkelen van sepsis. De klinische effecten als gevolg hiervan zorgen voor een mate van ernstig ongerief.

Pijnbestrijding (zoals buprenorphine of carprofen) ter verlichting van pijn is in dit model niet zinvol, aangezien de muizen geen fysieke pijn leiden als gevolg van een ingreep, maar wel doodziek zijn als gevolg van de ontwikkelde sepsis. Tevens willen wij de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) bestuderen; het gebruik van NSAID's (anti-inflammatoir middel) zou dus al zelf een effect hebben op de ontstane ontstekingsreacties, en zodoende de mogelijke effecten van IL37 kunnen beïnvloeden.

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

Ter verlichting van het ongerief zal voer worden aangeboden in de kooi (papvoer) in plaats van in de ruif. Tevens zal gebruik gemaakt worden van drinkflessen met een extra lange tuit, zodat de muizen zich minder ver hoeven te strekken om te kunnen drinken. **De kooien worden voor een deel geplaatst op warmtematjes, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven om zo hun lichaamstemperatuur op peil te houden.**

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.

De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

-de muizen ondergaan extra ongerief als gevolg van condities die niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).

-gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.

-Te hoge totaal score (5 of hoger) voor kenmerken van algeheel ongerief: uitdroging, activiteit, vachtstructuur. Deze parameters zullen worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren (elke parameter individueel gescoord op schaal van 0-2).

-betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment.

-de muizen ondergaan meer ongerief dan verantwoord kan worden voor de doelstelling van het beschreven project, welke door de DEC is gewogen in de huidige projectaanvraag.

Wanneer het humaan eindpunt is bereikt, zal een muis actief uit de studie worden genomen door middel van euthanasie. Daarnaast blijven de muizen maximaal 48uur in het experiment.

Indicate the likely incidence.

Naarmate de muizen langer in studie zitten (24uur/48uur) kan de incidentie van het humaan eindpunt in wild type muizen als gevolg van sepsis groter worden. Er wordt echter een sublethale dosis LPS gebruikt, waardoor de muizen hier niet aan hoeven te overlijden. Zoals bekend uit de literatuur (Nold M *et al.* Nat Imm 2010) heeft endogene expressie van IL37 een beschermde werking tegen de effecten van sepsis. Daarnaast is uit overige studies bekend dat exogeen toegediend recombinant IL37 een beschermende werking geeft in verschillende experimentele modellen (Moretti S *et al.* PLoS Pathog 2014; Ballak DB *et al.* Nat Commun 2014; Li S *et al.* PNAS 2015). Onze hypothese stelt dat het exogeen toegediend recombinant IL37 eiwit ook functioneel beschermt tegen het ontwikkelen van sepsis-gemedieerde AKI. De incidentie van het bereiken van het humaan eindpunt in deze experimentele groep zal daarom naar onze verwachting lager zijn ten opzichte van de controle groep (LPS+vehicle).

In verschillende studies is laten zien dat EPO toediening een beschermend effect heeft tijdens sepsis-gemedieerd AKI (Coldewey SM *et al.* Kidney Int 2013; Aoshiba K *et al.* Crit Care Med 2009). De incidentie van het bereiken van het humaan eindpunt in deze experimentele groep (welke fungeert als positieve controle) zal daarom naar onze verwachting ook lager zijn ten opzichte van de controle groep (LPS+vehicle).

De groepen muizen welke allereerst vehicle krijgen in plaats van LPS zullen geen sepsis en/of AKI ontwikkelen, waardoor de incidentie van het humaan eindpunt in deze groepen muizen minimaal zal zijn.

De verwachte incidentie in WT+LPS muizen is 5-10%; de verwachte incidentie in WT+rec.IL37 en/of EPO muizen is 0-5%. De verwachte incidentie in de vehicle groepen is 0%.

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).

De mate van ongerief in de LPS+vehicle groep is ingeschat als ernstig (**20%**). De andere groepen muizen (LPS+recombinant IL37 en LPS+EPO) worden ingeschat als matig ongerief (**40%**).

De mate van ongerief in de controle (vehicle) groepen wordt ingeschat als mild (**40%**), aangezien deze muizen geen sepsis en/of AKI zullen ontwikkelen.

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.

De groepen muizen zullen actief worden geofferd op verschillende tijdstippen na de initiële injectie van LPS gevolgd door injectie met vehicle/IL37/EPO, ten einde om organen en bloed te kunnen isoleren.

Hierin kunnen we belangrijke serologische, histologische en biochemische parameters bestuderen welke essentieel zijn voor het bepalen van de rol van exogene IL37 toediening in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen, en deze effecten te kunnen vergelijken met de beschermende werking van EPO toediening.

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 2015-0101
2. Titel van het project: Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?
3. Titel van de NTS: Wat is de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) in het ontstaan van acuut nierfalen tijdens bloedvergiftiging?
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: 25-08-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 08-09-2015 en 06-10-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 15-09-2015 tot 22-09-2015 en van 13-10-2015 tot 15-10-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-09-2015 en 15-10-2015
 - advies aan CCD: 12-11-2015
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: 15-09-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Niet-technische samenvatting:**
 - 3.5 De categorie matig tot ernstig ongerief bestaat niet. De onderzoekers worden verzocht op te schrijven welk percentage van de dieren matig en welk percentage ernstig ongerief zullen ondergaan.
 - 4.2 Voor een leek zal het niet duidelijk zijn waarom dit leidt tot vermindering. Is het genoemde aantal dieren een minimum of een maximum aantal?

4.4 De onderzoekers worden verzocht alleen de maatregelen te noemen die het ongerief voor de proefdieren zo beperkt mogelijk houden. Het is onwenselijk hier te noemen dat elk experiment zeer goed wordt voorbereid en alleen wordt uitgevoerd door gecertificeerde onderzoekers, aangezien men er van uit mag gaan dat onderzoekers altijd gecertificeerd zijn en zich zeer zorgvuldig zullen voorbereiden op een experiment. Dit zijn voorwaarden om proefdieronderzoek te mogen doen, en geen maatregelen die een onderzoeker neemt om het ongerief voor de dieren te beperken.

Project Proposal:

-3.1 De laatste 25 jaar is er een enorme hoeveelheid onderzoek verricht om de 'magic bullet' te vinden die zou kunnen beschermen tegen multi-orgaanfalen door sepsis. Historisch gezien heeft dergelijk onderzoek nauwelijks translationele waarde gehad, omdat de positieve bevindingen in een veelheid van diersystemen niet extrapoleerbaar bleken naar de mens. Waarom verwachten de onderzoekers dat in dit specifieke geval hun eventuele resultaten wel translationele waarde zullen hebben? Zijn er voorbeelden beschikbaar waar onderzoek in de muis geleid heeft tot (meer dan ondersteunende) therapie bij dit ziektebeeld in de mens?

-3.1. Kunnen de onderzoekers hier uitgebreider toelichten waarom de hIL37tg muis een goed model is voor de humane situatie? Zij worden verzocht daarbij ook aan te geven wanneer IL37 tot expressie komt in de transgene dieren en in de mens, en op welke receptor het hIL37 in de muizen werkt.

3.4.3 Uit translationeel oogpunt is het logischer om eerst onderdeel B te doen, en alleen bij bewezen effect het werkingsmechanisme uit te zoeken (onderdeel A). Het uitblijven van een therapeutisch effect zou dan een 'no go moment' vormen voor de experimenten met de hIL37tg muis.

Description of Animal Procedures:

-DAP 1.

*B De onderzoekers willen mannelijke muizen gebruiken om 'de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerd AKI te minimaliseren' (of uit te sluiten?). Welke aanwijzingen hebben de onderzoekers dat de hormooncyclus een dergelijk effect kan hebben in deze proefopzet? Kunnen zij een schatting maken van de toename in spreiding indien zij ook vrouwelijke dieren zouden gebruiken en tot welke toename in proefdieraantallen dit zou leiden?

*D, tweede vraag. Temperatuurdaling als gevolg van LPS-injectie ontbreekt in de opsomming (ook bij onderdeel I). De commissie denkt dat het goed zou zijn om hier ook de mogelijke maatregelen te bespreken om de welzijnsgevolgen van de temperatuurdaling te beperken (bijvoorbeeld een couveuse). Als daar van af wordt gezien, dan zou ook vermeld moeten worden waarom dergelijke maatregelen niet mogelijk zijn.

*J. De onderzoekers worden verzocht de humane eindpunten preciezer te formuleren, en de geschatte incidentie getalsmatig (bijvoorbeeld als percentage) uit te drukken.

*K. Het percentage van de dieren dat respectievelijk ernstig, matig of licht ongerief zal ondergaan is niet gegeven.

-DAP2

-De onderzoekers worden verzocht na te gaan welke opmerkingen over DAP1 ook van toepassing zijn op DAP2 en dit aan te passen.

*A. Het ziektebeloop van de muizen in groep 2-3 en groep 2-2 zal worden vergeleken met het ziektebeloop van de muizen in groep 2-1. Waartoe dienen de drie vehicle groepen en waarom zijn daar ook 15 dieren per groep voor nodig?

- Datum antwoord: 22-09-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-(3.5) In het beschreven project zullen enkele groepen proefdieren worden blootgesteld aan moderate of ernstig ongerief. De verwachting is dat de wild type muizen ernstig ongerief zullen ondervinden (ongeveer 40%), terwijl de transgene muis welke IL37 tot expressie brengt matig ongerief zal ondervinden (ongeveer 40%). De controle groepen zullen slechts mild ongerief krijgen, aangezien deze geen sepsis zullen ontwikkelen (ongeveer 20%).

-(4.2) Het minimum aantal muizen wat is benodigd per experimentele groep om mogelijke verschillen tussen groepen aan te tonen is berekend aan de hand van resultaten uit reeds beschreven studies uit de literatuur. Door deze gegevens te gebruiken voor het opzetten van de huidige studie wordt voorkomen dat onnodig teveel dieren worden geïncubeerd per experimentele groep. Het op deze manier berekende totaal aantal benodigde dieren is 240 muizen (zie 3.3).

-(4.4) Om de negatieve gevolgen van het ontstaan van bloedvergiftiging te beperken zullen de muizen in een verwarmde omgeving worden gezet, zodat de lichaamstemperatuur beter op peil kan worden gehouden. Tevens wordt gezorgd voor een vergemakkelijkt aanbod van drinkwater en voer (gebruik van verlengde spuitmond van drinkfles en papvoer in kooi), waardoor de toegankelijkheid geoptimaliseerd is. Daarnaast zullen de negatieve gevolgen van een experiment zeer strikt worden beschreven en gecontroleerd door zowel de onderzoeker als medewerkers van het dierenlaboratorium. Mochten de negatieve gevolgen voor de dieren groter zijn dan de beschreven verwachte gevolgen, zal er actie ondernomen worden waarbij het dier geofferd wordt.

Project Proposal:

-(3.1) Wij onderschrijven dat met name in dit onderzoeksveld meerdere therapeutische strategieën die veelbelovend leken op basis van proefdieronderzoek niet werkzaam bleken bij de mens. Wij verwachten ook niet de 'magic bullet' te vinden die multi-orgaanfalen bij sepsis kan voorkomen. Echter, gezien de frequentie en ernst van het ziektebeeld zijn ook kleinere bijdragen aan een betere prognose en/of therapie voor deze patiënten meer dan welkom. Wij kunnen ons niet goed voorstellen hoe wetenschappelijke en medische vooruitgang kan worden geboekt zonder potentiële therapeutische strategieën uit te testen in proefdiermodellen.

Enkele voorbeelden van de afgelopen jaren waarbij onderzoek op dit gebied bij muizen/ratten heeft geleid tot toepassingen bij de mens zijn het beschermend effect van alkalisch fosfatase op sepsisgeïnduceerd acuut nierfalen (Pickkers P et al. Crit Care 2012), en het gunstig effect van interferon-beta-1a op ARDS (Bellingan G et al. Lancet Respir Med 2014).

Recent is een sterke focus ontstaan op de ontrafeling van cascades behorende tot het aangeboren immuunsysteem, en de rol daarvan in de pathofysiologie van sepsis.

Fundamenteel en preklinisch onderzoek heeft uitgewezen dat onder andere toll-like receptoren (TLR2 en TLR4) behorende tot het aangeboren immuunsysteem een belangrijke rol spelen in de pathofysiologie van sepsis. Meerdere klinische trials zijn momenteel lopende om de effecten van specifieke antagonisten voor receptoren van het aangeboren immuunsysteem te onderzoeken. Zo neemt het [REDACTED] deel aan een multicenter studie naar het effect van een antistof tegen TLR2 bij ischemie-reperfusie schade na niertransplantatie. Een belangrijke conclusie die wordt getrokken uit de resultaten van afgeronde studies is dat de blokkade van één specifieke receptor-ligand interactie hoogstwaarschijnlijk niet afdoende blijkt om de gehele pathofysiologie van sepsis en nierfalen te kunnen remmen/voorkomen. In het huidige project focussen wij op het anti-inflammatoire cytokine Interleukine-37, wat een algemene remmer is van het aangeboren immuunsysteem. De werking van IL37 is niet gericht tegen één specifieke receptor, maar remt verschillende immunologische signaleringscascades, waaronder die van TLR2, TLR4 en TLR9 (Nold MF et al. Nat Immunol 2010). Daarnaast is gebleken dat de transgene expressie van IL37 een beschermende werking geeft tegen het ontwikkelen van sepsis bij de muis (Nold MF et al. Nat Immunol 2010), zonder dat daarbij specifiek is gekeken naar het effect op de nier en het ontstaan van acuut nierfalen. Onze hypothese is dat IL37 een remmende werking heeft op ontstekingsprocessen en daarmee beschermt tegen nierfalen als gevolg van sepsis. Op basis van de belangrijke rol van het aangeboren immuunsysteem in de pathofysiologie van sepsis, de zeer krachtige ontstekingsremmende werking van IL37 in verschillende fundamentele en preklinische studies en het feit dat IL37 een endogeen humaan molecuul is, hopen wij dat de behaalde resultaten van deze studie translationele waarde zullen hebben.

-(3.1) In de mens komt IL37 in vele celtypen tot expressie, waaronder verschillende subtypen immuuncellen (zoals leukocyten en dendritische cellen) alsook in (nier) epitheliale cellen (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Basale endogene expressie van IL37 is laag, en wordt pas sterk opgereguleerd door inflammatoire stimuli (Bufler P et al. Biochem J. 2004; Imaeda H et al. Clin Exp Immunol 2013). De ontstekingsremmende werking van IL37 verloopt zowel via intracellulaire cascades die de transcriptie van proinflammatoire genen remmen (door 'endogene' IL37 expressie), als via exogeen IL37 wanneer dit eiwit aanwezig is in het extracellulaire milieu (Bulau AM et al. PNAS 2014). Extracellulair IL37 kan zijn ontstekingsremmende werking uitvoeren door binding aan de alfa-keten van de IL18-receptor (IL18R), in samenwerking met de co-receptor IL1R8 (Nold-Petry CA et al. Nat Immunol 2015; Li S et al. PNAS 2015). Aangezien er bij de muis geen homoloog van humaan IL37 bekend is, wordt voor de bestudering van de rol van IL37 in vivo gebruik gemaakt van een muis welke transgeen gemaakt is voor humaan IL37 (hIL37tg). Deze hIL37tg muis brengt humaan IL37 constitutief in alle lichaamscellen tot expressie, en vormt zo de basis voor het huidige en reeds verrichte onderzoek naar de effecten en werkingsmechanismen van IL37 (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Ondanks dat IL37 expressie gekoppeld is aan de constitutief actieve CMV-promoter in alle transgene cellen, is de basale transcriptie laag en vindt er opregulering plaats door inflammatoire stimuli (Nold et al. Nat Imm 2010). Hierdoor komt de kinetiek van IL37 expressie in deze hIL37tg muis overeen met de humane situatie. Ook voor exogeen toegediend IL37 eiwit is er in een muis een functioneel signaleringsmechanisme aanwezig (er is expressie van zowel IL18R en IL1R8 in de muis, waaraan IL37 bindt) (Nold-Petry CA et al. Nat Immunol 2015). In verschillende experimentele modellen met behulp van

de hIL37tg muis is gebleken dat IL37 een zeer krachtige anti-inflammatoire en beschermende functie heeft in diverse ziekteprocessen, waaronder colitis (McNamee EN et al. PNAS 2011), obesitas (Ballak DB et al. Nat Commun 2014), myocardiaal infarct (Wu B et al. Clin Exp Immunol 2014) en nier ischemie/reperfusie schade (Yang Y et al. Kidney Int 2014). Tevens is met behulp van de hIL37tg muis beschreven dat IL37 expressie een beschermende werking heeft tegen het optreden van LPS-geïnduceerde septische shock, welke leidt tot een sterke reductie van de systemische spiegels van diverse pro-inflammatoire cytokines en verminderde leverfunctiestoornissen (Nold MF et al. Nat Imm 2010). In deze studie is echter niet gekeken naar de effecten van IL37 expressie op de lokale pathofysiologische consequenties van sepsis in de nier, en ook niet naar de effecten van IL37 op LPS-geïnduceerd AKI.

-(3.4.3) Er zal worden begonnen met het uitvoeren van deelexperiment A, gevolgd door deelexperiment B. De resultaten uit deelexperiment A zullen niet de opzet van deelexperiment B beïnvloeden, aangezien in beide deelexperimenten naar verschillende vormen van IL37 eiwit gekeken wordt (in deelexperiment A kijken we naar de rol van endogeen IL37 expressie; in deelexperiment B kijken we naar het effect van toegediend exogeen IL37 eiwit). Uit een recente studie is gebleken dat endogene IL37 expressie een beschermend effect geeft op het ontwikkelen van sepsis (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Hierdoor is naar onze verwachting deelexperiment A optimaal om de werking van endogeen IL37 in het ontstaan van AKI als gevolg van sepsis te bestuderen. Extracellulair IL37 kan additieve effecten hebben bovenop de rol van endogeen IL37. Dit blijkt uit het feit dat het voorbehandelen van hIL37tg muizen met IL37-blokkerende antilichamen een geneutraliseerd effect geeft na LPS toediening (Bulau AM et al. PNAS 2014). Het uitblijven van een eventueel therapeutisch effect van exogene IL37 toediening in deelexperiment B hoeft dus niet te betekenen dat er geen functie en/of rol is voor endogene IL37 expressie in het ontstaan van acuut nierfalen tijdens sepsis (deelexperiment A). Wanneer er wel een effect gevonden wordt van endogene IL37 expressie (doel van deelexperiment A) kan dit namelijk aanleiding geven tot vervolgstudies waarin getracht wordt om het endogene expressie niveau van IL37 te moduleren, om zodoende bescherming te bieden tegen sepsis-gemedieerd AKI. Naar ons idee hoeven de resultaten van beide deelexperimenten elkaar dus niet te blokkeren.

Description of Animal Procedures:

Bijlage 1 (DAP1)

-(B) In eerdere studies is telkens gebruik gemaakt van mannelijke muizen, ten einde de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerde AKI uit te sluiten. Verschillende studies laten namelijk zien dat er sexe-verschillen zijn in de immunologische respons tijdens het ontwikkelen van sepsis, als gevolg van verschillende functies van androgenen en oestrogenen (Angele MK et al. Virulence 2014; Marriott I et al. Immunologic Research 2006; Marriott I et al. Journal of Reproductive Immunology 2006; Aoyama M et al. Shock 2009). Aangezien wij in dit project juist een eiwit willen bestuderen dat een specifieke rol heeft in de immunologische reacties, zou het gebruik van vrouwelijke muizen of een mix van m/v muizen inderdaad kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameters, waardoor een hogere n aan muizen benodigd zou zijn. Hoe groot dit effect zou zijn kunnen we niet goed inschatten. Bij een positief resultaat van het onderzoek zouden we kunnen overwegen de experimenten te

herhalen met vrouwelijke muizen om de generaliseerbaarheid van de effecten te bestuderen.

-(D 2e vraag; en I) Na het induceren van sepsis(-gemedieerd AKI) door middel van LPS injectie kan de muis een sterk ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: daling van de lichaamstemperatuur, verminderde eetlust/drinken, verminderde activiteit, uitdroging, gewichtsafname). Ter verlichting van het ongerief zullen de kooien deels op warmtematjes worden geplaatst, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven. Tevens krijgen de muizen extra kooiverrijking en papvoer aangeboden. Daarnaast worden drinkflessen met langere spuit gebruikt waardoor muizen minder ver hoeven te reiken om te drinken, ter vermindering van de uitdroging. De gebruikte sublethale dosis LPS is afgeleid van studies uit de literatuur, en tevens worden de voorgestelde tijdstippen waarop de muizen worden geofferd ook in andere studies gebruikt om zodoende verschillende typen uitleesparameters te onderzoeken (acute fase, latere functionele fase).

Deze vermelding van daling in lichaamstemperatuur als gevolg van sepsis en het gebruik van warmtematjes ter verlichting van het ongerief is tevens opgenomen onder onderdeel I.

-(J-2): De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

-de muizen ondergaan extra ongerief als gevolg van condities die niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).

-gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.

-Te hoge totaal score (≥ 5) voor kenmerken van algeheel ongerief: uitdroging, activiteit, vachtstructuur. Deze parameters zullen worden gemonitord aan de hand van individuele welzijns-scoreformulieren (elke parameter individueel gescoord op schaal van 0-2).

-betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment.

-de muizen ondergaan meer ongerief dan verantwoord kan worden voor de doelstelling van het beschreven project, welke door de DEC is gewogen in de huidige projectaanvraag.

Wanneer het humaan eindpunt is bereikt, zal een muis actief uit de studie worden genomen door middel van euthanasie. Daarnaast blijven de muizen maximaal 48uur in het experiment.

-(J-3): De verwachte incidentie in WT muizen is 5-10%; de verwachte incidentie in de hIL37tg muizen is 0-5%.

-(K) De mate van ongerief in de experimentele groepen welke LPS injecties krijgen is ingeschat als ernstig. Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien deze het gevolg is van het induceren van sepsis door middel van LPS injecties.

Aan de hand van de hypothese wordt in de hIL37tg muisgroep (40%) een matig niveau van ongerief verwacht ten opzichte van de wild type controle muizen (ernstig; 40%).

De mate van ongerief in de controle groepen wordt ingeschat als mild (20%), aangezien deze muizen geen sepsis zullen ontwikkelen.

Bijlage 2 (DAP2):

- Ook voor DAP2 zijn de velden aangepast met betrekking tot 'gekozen sexe' (B), 'welzijnsgevolgen' (D-2 en I), 'humaan eindpunt en incidentie' (J-2/3) en (K).

-(A) De groepen 1-1 (vehicle+saline), 1-2 (vehicle+recombinant IL37) en 1-3 (vehicle+ EPO) dienen ervoor om de individuele basale effecten van het toegediende IL37 en EPO te karakteriseren. De toegediende componenten kunnen namelijk al een basaal effect teweeg brengen op bijvoorbeeld functionele parameters en/of inflammatoire markers (gen expressie

levels en/of basale cytokine waarden, infiltratie van inflammatoire cellen in nierweefsel). Om een gedegen uitspraak te kunnen doen over de effectieve (beschermende) gevolgen van recombinant IL37 en/of EPO toediening tijdens het ontwikkelen van sepsis en daaropvolgend acuut nierfalen, dienen we ook deze basale effecten in kaart te brengen. IL37 en EPO signaleren en functioneren beiden via andere signaleringscascades, zodat het niet mogelijk is om deze te combineren in één controlegroep. Groep 1-1 fungeert als de basale controle groep.

Naar onze inschatting zal er in de 3 controle groepen minder spreiding in de uitleesparameters optreden in vergelijking met de resultaten afkomstig uit groepen 2-1, 2-2 en 2-3, welke wel sepsis ontwikkelen. We hebben daarom een wijziging doorgevoerd zodat we voor deze controle groepen in plaats van 15 maximaal 10 muizen/groep benodigd denken te hebben. Deze veranderingen zijn doorgevoerd in (3-1), (K-1) en 'Table:Animals'.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum:13-10-2015

- Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting

-Het aantal muizen is aangepast in de bijlagen, maar nog niet in de NTS. De onderzoekers worden verzocht dit alsnog te doen.

- Datum antwoord: 15-10-2015

- Strekking van de antwoorden:

Niet technische-samenvatting:

-Naar aanleiding van deze opmerking zijn voor zowel paragraaf (3.3) en (4.2) in de NTS de wijzigingen doorgevoerd, en zodoende de correcte hoeveelheid te gebruiken muizen weergegeven (n=225 muizen totaal; n=75 muizen in deelproject B).

- 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 'het bestuderen van de functionele contributie en de therapeutische potentie van het ontstekingsremmend eiwit IL37 in sepsis-gemedieerd AKI.' De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken wat de rol is van endogeen IL37 tijdens sepsis en het daaropvolgend acuut nierfalen bij muizen. Voorts zal duidelijk worden of toediening van IL37 (dus exogeen IL37) de nierschade door sepsis bij muizen kan verminderen. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapieën om acuut nierfalen door sepsis te voorkomen. Acuut nierfalen komt frequent voor bij mensen die zijn opgenomen in een ziekenhuis, en wordt voornamelijk veroorzaakt door sepsis. Het is aannemelijk dat meer inzicht in de moleculaire en cellulaire mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan van acuut nierfalen door sepsis bij muizen zal bijdragen aan de ontwikkeling van therapeutische interventies. De commissie heeft gediscussieerd over de predictieve validiteit van het gebruikte model. De antwoorden van de onderzoeker op de vragen die de commissie hierover heeft gesteld, hebben de commissie voldoende overtuigd. Op dit moment is er geen effectieve behandeling van sepsis-gemedieerd acuut nierfalen, waardoor de helft van de patiënten hier op korte of langere termijn aan overlijdt. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere therapieën voor sepsis-gemedieerd nierfalen, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel.
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 de functie van IL37 in moleculaire en cellulaire mechanismen tijdens sepsis en daaropvolgend acuut nierfalen, en het effect van toediening van IL37 ter preventie van acuut nierfalen door sepsis bij muizen.
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 gevolgen van de intraperitoneale injectie van LPS. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde i.p. of s.c. injecties en het doden onder anesthesie in als licht. Het ongerief als gevolg van de LPS injectie en daarop volgende systemische afweerreactie schat de DEC in als matig voor de muizen die transgeen zijn voor humaan IL37, en ernstig voor de wildtype dieren. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 27% van de dieren, matig voor 40% van de dieren en ernstig voor de overige 33% 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. De onderdelen van dit project die in vitro onderzocht kunnen worden zijn reeds uitgevoerd. Voor de resterende onderdelen is onderzoek met dieren noodzakelijk.
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 het verminderen van het aantal dieren in de controlegroepen, wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.

De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 225 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. Er wordt adequate invulling gegeven aan de extra verzorgingsbehoefte van de zieke dieren. Op verzoek van de commissie krijgen de zieke dieren ook de mogelijkheid op een verwarmde ondergrond te verblijven. 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 bijdrage van IL37 in de moleculaire en cellulaire mechanismen betrokken bij sepsis-gemedieerd acuut nierfalen, en in het effect van toediening van IL37 ter preventie van sepsis-gemedieerd acuut nierfalen bij muizen. Op termijn kunnen deze inzichten bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën om acuut nierfalen door sepsis te voorkomen. Het belang van deze wetenschappelijke inzichten en de ontwikkeling van therapieën voor sepsis-gemedieerd acuut nierfalen acht de DEC substantieel, gezien het frequent optreden van acuut nierfalen door sepsis bij patiënten die zijn opgenomen in een ziekenhuis, en de ernst van deze complicatie.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 27% van de dieren licht ongerief, 40% van de dieren matig ongerief en 33% van de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het sepsismodel 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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Postbus 9101, [REDACTED]
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
AVD103002015313

Betreft: Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

Factuurdatum: 17 november 2015
Vervaldatum: 17 december 2015
Factuurnummer: 15700313
Factuurnummer: 040823-461220/2015-0101/[REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015313	€ 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
AVD103002015313

Bijlagen

2

Datum 17 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 14 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015313. 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, t.a.v. [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Postdoctoraal onderzoeker
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: 12 december 2015
Geplande einddatum: 12 december 2020
Titel project: Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?
Titel niet-technische samenvatting: Wat is de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) in het ontstaan van acuut nierfal
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: 13 november 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
AVD103002015313

Bijlagen

2

Datum 17 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 november 2015

Vervaldatum: 17 december 2015

Factuurnummer: 15700313

Ordernummer: 040823-461220/2015-0101/

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015313	€ 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

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101 t.a.v. [REDACTED]
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
AVD103002015313
Bijlagen
1

18 DEC. 2015

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 14 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?" met aanvraagnummer AVD103002015313. 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 "Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?" starten. De vergunning wordt afgegeven vanaf dagtekening van deze brief tot en met 12 december 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 RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 12 november 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.

Wij hebben bij de beraadslaging het volgende mee gewogen over het gebruik van alleen mannelijke dieren: De commissie ziet dat het een project betreft dat aan het begin staat van nieuwe ontwikkelingen. Er zijn daarom veel variabelen in de experimentele opzet die spreiding in de data kunnen veroorzaken. Het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren kan in dit geval resulteren in zoveel spreiding in de data dat de gestelde projectdoelen niet gehaald kunnen worden. Daarom is besloten het gebruik van alleen mannelijke dieren in dit specifieke project toe te staan.

Voor een eventueel vervolgproject blijft het uitgangspunt van de CCD van kracht dat zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt dienen te worden. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit. Met het oog op artikel 10a2 van de Wod zijn twee algemene voorwaarden toegevoegd.

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, t.a.v. [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak vanaf dagtekening van deze brief tot en met 12 december 2020, voor het project "Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?" met aanvraagnummer AVD103002015313, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Postdoctoraal onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is de postdoctoraal onderzoeker nefrologie verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 14 november 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 november 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 november 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 12 november 2015, ontvangen op 14 november 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
proef 1: Deelexp. A: Het bestuderen van de functionele contributie van IL37 in sepsis-gemedieerd AKI	Muizen (Mus musculus) / hIL37tg dieren en C57BL/6J wild type (Charles River)	150	Ernstig / severe	Er worden transgene dieren gebruikt
proef 2: Deelexp. B: Het bestuderen van de therapeutische potentie van exogene IL37 toediening gedurende sepsis-gemedieerd AKI	Muizen (Mus musculus) / C57B/6J wild type (Charles River)	75	Ernstig / severe	nvt

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.

Voorschriften

Omdat er sprake is van ernstig ongerief is een beoordeling achteraf vereist, uiterlijk 12 december 2021.

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.

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.

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.

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0101
2. Titel van het project: Wat is de rol van Interleukine-37 in sepsis-gemedieerd acuut nierfalen?
3. Titel van de NTS: Wat is de rol van een ontstekingsremmend eiwit (IL37) in het ontstaan van acuut nierfalen tijdens bloedvergiftiging?
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: 25-08-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 08-09-2015 en 06-10-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 15-09-2015 tot 22-09-2015 en van 13-10-2015 tot 15-10-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-09-2015 en 15-10-2015
 - advies aan CCD: 12-11-2015
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: 15-09-2015
 - Strekking van de vragen:
Niet-technische samenvatting:
3.5 De categorie matig tot ernstig ongerief bestaat niet. De onderzoekers worden verzocht op te schrijven welk percentage van de dieren matig en welk percentage ernstig ongerief zullen ondergaan.
4.2 Voor een leek zal het niet duidelijk zijn waarom dit leidt tot vermindering. Is het genoemde aantal dieren een minimum of een maximum aantal?

4.4 De onderzoekers worden verzocht alleen de maatregelen te noemen die het ongerief voor de proefdieren zo beperkt mogelijk houden. Het is onwenselijk hier te noemen dat elk experiment zeer goed wordt voorbereid en alleen wordt uitgevoerd door gecertificeerde onderzoekers, aangezien men er van uit mag gaan dat onderzoekers altijd gecertificeerd zijn en zich zeer zorgvuldig zullen voorbereiden op een experiment. Dit zijn voorwaarden om proefdieronderzoek te mogen doen, en geen maatregelen die een onderzoeker neemt om het ongerief voor de dieren te beperken.

Project Proposal:

-3.1 De laatste 25 jaar is er een enorme hoeveelheid onderzoek verricht om de 'magic bullet' te vinden die zou kunnen beschermen tegen multi-orgaanfalen door sepsis. Historisch gezien heeft dergelijk onderzoek nauwelijks translationele waarde gehad, omdat de positieve bevindingen in een veelheid van diermodellen niet extrapoleerbaar bleken naar de mens. Waarom verwachten de onderzoekers dat in dit specifieke geval hun eventuele resultaten wel translationele waarde zullen hebben? Zijn er voorbeelden beschikbaar waar onderzoek in de muis geleid heeft tot (meer dan ondersteunende) therapie bij dit ziektebeeld in de mens?

-3.1. Kunnen de onderzoekers hier uitgebreider toelichten waarom de hIL37tg muis een goed model is voor de humane situatie? Zij worden verzocht daarbij ook aan te geven wanneer IL37 tot expressie komt in de transgene dieren en in de mens, en op welke receptor het hIL37 in de muizen werkt.

3.4.3 Uit translationeel oogpunt is het logischer om eerst onderdeel B te doen, en alleen bij bewezen effect het werkingsmechanisme uit te zoeken (onderdeel A). Het uitblijven van een therapeutisch effect zou dan een 'no go moment' vormen voor de experimenten met de hIL37tg muis.

Description of Animal Procedures:

-DAP 1.

*B De onderzoekers willen mannelijke muizen gebruiken om 'de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerd AKI te minimaliseren' (of uit te sluiten?). Welke aanwijzingen hebben de onderzoekers dat de hormooncyclus een dergelijk effect kan hebben in deze proefopzet? Kunnen zij een schatting maken van de toename in spreiding indien zij ook vrouwelijke dieren zouden gebruiken en tot welke toename in proefdieraantallen dit zou leiden?

*D, tweede vraag. Temperatuurdaling als gevolg van LPS-injectie ontbreekt in de opsomming (ook bij onderdeel I). De commissie denkt dat het goed zou zijn om hier ook de mogelijke maatregelen te bespreken om de welzijnsgevolgen van de temperatuurdaling te beperken (bijvoorbeeld een couveuse). Als daar van af wordt gezien, dan zou ook vermeld moeten worden waarom dergelijke maatregelen niet mogelijk zijn.

*J. De onderzoekers worden verzocht de humane eindpunten preciezer te formuleren, en de geschatte incidentie getalsmatig (bijvoorbeeld als percentage) uit te drukken.

*K. Het percentage van de dieren dat respectievelijk ernstig, matig of licht ongerief zal ondergaan is niet gegeven.

-DAP2

-De onderzoekers worden verzocht na te gaan welke opmerkingen over DAP1 ook van toepassing zijn op DAP2 en dit aan te passen.

*A. Het ziektebeloop van de muizen in groep 2-3 en groep 2-2 zal worden vergeleken met het ziektebeloop van de muizen in groep 2-1. Waartoe dienen de drie vehicle groepen en waarom zijn daar ook 15 dieren per groep voor nodig?

- Datum antwoord: 22-09-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-(3.5) In het beschreven project zullen enkele groepen proefdieren worden blootgesteld aan moderate of ernstig ongerief. De verwachting is dat de wild type muizen ernstig ongerief zullen ondervinden (ongeveer 40%), terwijl de transgene muis welke IL37 tot expressie brengt matig ongerief zal ondervinden (ongeveer 40%). De controle groepen zullen slechts mild ongerief krijgen, aangezien deze geen sepsis zullen ontwikkelen (ongeveer 20%).

-(4.2) Het minimum aantal muizen wat is benodigd per experimentele groep om mogelijke verschillen tussen groepen aan te tonen is berekend aan de hand van resultaten uit reeds beschreven studies uit de literatuur. Door deze gegevens te gebruiken voor het opzetten van de huidige studie wordt voorkomen dat onnodig teveel dieren worden geïncubeerd per experimentele groep. Het op deze manier berekende totaal aantal benodigde dieren is 240 muizen (zie 3.3).

-(4.4) Om de negatieve gevolgen van het ontstaan van bloedvergiftiging te beperken zullen de muizen in een verwarmde omgeving worden gezet, zodat de lichaamstemperatuur beter op peil kan worden gehouden. Tevens wordt gezorgd voor een vergemakkelijkt aanbod van drinkwater en voer (gebruik van verlengde spuitmond van drinkfles en papvoer in kooi), waardoor de toegankelijkheid geoptimaliseerd is. Daarnaast zullen de negatieve gevolgen van een experiment zeer strikt worden beschreven en gecontroleerd door zowel de onderzoeker als medewerkers van het dierenlaboratorium. Mochten de negatieve gevolgen voor de dieren groter zijn dan de beschreven verwachte gevolgen, zal er actie ondernomen worden waarbij het dier geofferd wordt.

Project Proposal:

-(3.1) Wij onderschrijven dat met name in dit onderzoeksveld meerdere therapeutische strategieën die veelbelovend leken op basis van proefdieronderzoek niet werkzaam bleken bij de mens. Wij verwachten ook niet de 'magic bullet' te vinden die multi-orgaanfalen bij sepsis kan voorkomen. Echter, gezien de frequentie en ernst van het ziektebeeld zijn ook kleinere bijdragen aan een betere prognose en/of therapie voor deze patiënten meer dan welkom. Wij kunnen ons niet goed voorstellen hoe wetenschappelijke en medische vooruitgang kan worden geboekt zonder potentiële therapeutische strategieën uit te testen in proefdiermodellen.

Enkele voorbeelden van de afgelopen jaren waarbij onderzoek op dit gebied bij muizen/ratten heeft geleid tot toepassingen bij de mens zijn het beschermend effect van alkalisch fosfatase op sepsisgeïnduceerd acuut nierfalen (Pickkers P et al. Crit Care 2012), en het gunstig effect van interferon-beta-1a op ARDS (Bellingan G et al. Lancet Respir Med 2014).

Recent is een sterke focus ontstaan op de ontrafeling van cascades behorende tot het aangeboren immuunsysteem, en de rol daarvan in de pathofysiologie van sepsis.

Fundamenteel en preklinisch onderzoek heeft uitgewezen dat onder andere toll-like receptoren (TLR2 en TLR4) behorende tot het aangeboren immuunsysteem een belangrijke rol spelen in de pathofysiologie van sepsis. Meerdere klinische trials zijn momenteel lopende om de effecten van specifieke antagonisten voor receptoren van het aangeboren immuunsysteem te onderzoeken. Zo neemt het [REDACTED] deel aan een multicenter studie naar het effect van een antistof tegen TLR2 bij ischemie-reperfusie schade na niertransplantatie. Een belangrijke conclusie die wordt getrokken uit de resultaten van afgeronde studies is dat de blokkade van één specifieke receptor-ligand interactie hoogstwaarschijnlijk niet afdoende blijkt om de gehele pathofysiologie van sepsis en nierfalen te kunnen remmen/voorkomen. In het huidige project focussen wij op het anti-inflammatoire cytokine Interleukine-37, wat een algemene remmer is van het aangeboren immuunsysteem. De werking van IL37 is niet gericht tegen één specifieke receptor, maar remt verschillende immunologische signaleringscascades, waaronder die van TLR2, TLR4 en TLR9 (Nold MF et al. Nat Immunol 2010). Daarnaast is gebleken dat de transgene expressie van IL37 een beschermende werking geeft tegen het ontwikkelen van sepsis bij de muis (Nold MF et al. Nat Immunol 2010), zonder dat daarbij specifiek is gekeken naar het effect op de nier en het ontstaan van acuut nierfalen. Onze hypothese is dat IL37 een remmende werking heeft op ontstekingsprocessen en daarmee beschermt tegen nierfalen als gevolg van sepsis. Op basis van de belangrijke rol van het aangeboren immuunsysteem in de pathofysiologie van sepsis, de zeer krachtige ontstekingsremmende werking van IL37 in verschillende fundamentele en preklinische studies en het feit dat IL37 een endogeen humaan molecuul is, hopen wij dat de behaalde resultaten van deze studie translationele waarde zullen hebben.

-(3.1) In de mens komt IL37 in vele celtypen tot expressie, waaronder verschillende subtypen immuuncellen (zoals leukocyten en dendritische cellen) alsook in (nier) epitheliale cellen (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Basale endogene expressie van IL37 is laag, en wordt pas sterk opgeregeerd door inflammatoire stimuli (Bufler P et al. Biochem J. 2004; Imaeda H et al. Clin Exp Immunol 2013). De ontstekingsremmende werking van IL37 verloopt zowel via intracellulaire cascades die de transcriptie van proinflammatoire genen remmen (door 'endogene' IL37 expressie), als via exogeen IL37 wanneer dit eiwit aanwezig is in het extracellulaire milieu (Bulau AM et al. PNAS 2014). Extracellulair IL37 kan zijn ontstekingsremmende werking uitvoeren door binding aan de alfa-keten van de IL18-receptor (IL18R), in samenwerking met de co-receptor IL1R8 (Nold-Petry CA et al. Nat Immunol 2015; Li S et al. PNAS 2015). Aangezien er bij de muis geen homolog van humaan IL37 bekend is, wordt voor de bestudering van de rol van IL37 in vivo gebruik gemaakt van een muis welke transgeen gemaakt is voor humaan IL37 (hIL37tg). Deze hIL37tg muis brengt humaan IL37 constitutief in alle lichaamscellen tot expressie, en vormt zo de basis voor het huidige en reeds verrichte onderzoek naar de effecten en werkingsmechanismen van IL37 (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Ondanks dat IL37 expressie gekoppeld is aan de constitutief actieve CMV-promoter in alle transgene cellen, is de basale transcriptie laag en vindt er opregulering plaats door inflammatoire stimuli (Nold et al. Nat Imm 2010). Hierdoor komt de kinetiek van IL37 expressie in deze hIL37tg muis overeen met de humane situatie. Ook voor exogeen toegediend IL37 eiwit is er in een muis een functioneel signaleringsmechanisme aanwezig (er is expressie van zowel IL18R en IL1R8 in de muis, waaraan IL37 bindt) (Nold-Petry CA et al. Nat Immunol 2015). In verschillende experimentele modellen met behulp van

de hIL37tg muis is gebleken dat IL37 een zeer krachtige anti-inflammatoire en beschermende functie heeft in diverse ziekteprocessen, waaronder colitis (McNamee EN et al. PNAS 2011), obesitas (Ballak DB et al. Nat Commun 2014), myocardiaal infarct (Wu B et al. Clin Exp Immunol 2014) en nier ischemie/reperfusie schade (Yang Y et al. Kidney Int 2014). Tevens is met behulp van de hIL37tg muis beschreven dat IL37 expressie een beschermende werking heeft tegen het optreden van LPS-geïnduceerde septische shock, welke leidt tot een sterke reductie van de systemische spiegels van diverse pro-inflammatoire cytokines en verminderde leverfunctiestoornissen (Nold MF et al. Nat Imm 2010). In deze studie is echter niet gekeken naar de effecten van IL37 expressie op de lokale pathofysiologische consequenties van sepsis in de nier, en ook niet naar de effecten van IL37 op LPS-geïnduceerd AKI.

-(3.4.3) Er zal worden begonnen met het uitvoeren van deexperiment A, gevolgd door deexperiment B. De resultaten uit deexperiment A zullen niet de opzet van deexperiment B beïnvloeden, aangezien in beide deexperimenten naar verschillende vormen van IL37 eiwit gekeken wordt (in deexperiment A kijken we naar de rol van endogeen IL37 expressie; in deexperiment B kijken we naar het effect van toegediend exogeen IL37 eiwit). Uit een recente studie is gebleken dat endogene IL37 expressie een beschermend effect geeft op het ontwikkelen van sepsis (Nold MF et al. Nat Imm 2010). Hierdoor is naar onze verwachting deexperiment A optimaal om de werking van endogeen IL37 in het ontstaan van AKI als gevolg van sepsis te bestuderen. Extracellulair IL37 kan additieve effecten hebben bovenop de rol van endogeen IL37. Dit blijkt uit het feit dat het voorbehandelen van hIL37tg muizen met IL37-blokkerende antilichamen een geneutraliseerd effect geeft na LPS toediening (Bulau AM et al. PNAS 2014). Het uitblijven van een eventueel therapeutisch effect van exogene IL37 toediening in deexperiment B hoeft dus niet te betekenen dat er geen functie en/of rol is voor endogene IL37 expressie in het ontstaan van acuut nierfalen tijdens sepsis (deexperiment A). Wanneer er wel een effect gevonden wordt van endogene IL37 expressie (doel van deexperiment A) kan dit namelijk aanleiding geven tot vervolgstudies waarin getracht wordt om het endogene expressie niveau van IL37 te moduleren, om zodoende bescherming te bieden tegen sepsis-gemedieerd AKI. Naar ons idee hoeven de resultaten van beide deexperimenten elkaar dus niet te blokkeren.

Description of Animal Procedures:

Bijlage 1 (DAP1)

-(B) In eerdere studies is telkens gebruik gemaakt van mannelijke muizen, ten einde de potentiële invloed van de vrouwelijke geslachtscyclus op de pathofysiologische processen als gevolg van sepsis-gemedieerde AKI uit te sluiten. Verschillende studies laten namelijk zien dat er sexe-verschillen zijn in de immunologische respons tijdens het ontwikkelen van sepsis, als gevolg van verschillende functies van androgenen en oestrogenen (Angele MK et al. Virulence 2014; Marriott I et al. Immunologic Research 2006; Marriott I et al. Journal of Reproductive Immunology 2006; Aoyama M et al. Shock 2009). Aangezien wij in dit project juist een eiwit willen bestuderen dat een specifieke rol heeft in de immunologische reacties, zou het gebruik van vrouwelijke muizen of een mix van m/v muizen inderdaad kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameters, waardoor een hogere n aan muizen benodigd zou zijn. Hoe groot dit effect zou zijn kunnen we niet goed inschatten. Bij een positief resultaat van het onderzoek zouden we kunnen overwegen de experimenten te

herhalen met vrouwelijke muizen om de generaliseerbaarheid van de effecten te bestuderen.

-(D 2e vraag; en I) Na het induceren van sepsis(-gemedieerd AKI) door middel van LPS injectie kan de muis een sterk ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: daling van de lichaamstemperatuur, verminderde eetlust/drinken, verminderde activiteit, uitdroging, gewichtsafname). Ter verlichting van het ongerief zullen de kooien deels op warmtematjes worden geplaatst, waardoor de muizen een keuze hebben om op een verwarmde ondergrond te verblijven. Tevens krijgen de muizen extra kooiverrijking en papvoer aangeboden. Daarnaast worden drinkflessen met langere spuit gebruikt waardoor muizen minder ver hoeven te reiken om te drinken, ter vermindering van de uitdroging. De gebruikte sublethale dosis LPS is afgeleid van studies uit de literatuur, en tevens worden de voorgestelde tijdstippen waarop de muizen worden geofferd ook in andere studies gebruikt om zodoende verschillende typen uitleesparameters te onderzoeken (acute fase, latere functionele fase).

Deze vermelding van daling in lichaamstemperatuur als gevolg van sepsis en het gebruik van warmtematjes ter verlichting van het ongerief is tevens opgenomen onder onderdeel I.

-(J-2): De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

-de muizen ondergaan extra ongerief als gevolg van condities die niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).

-gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.

-Te hoge totaal score (≥ 5) voor kenmerken van algeheel ongerief: uitdroging, activiteit, vachtstructuur. Deze parameters zullen worden gemonitord aan de hand van individuele welzijns-scoreformulieren (elke parameter individueel gescoord op schaal van 0-2).

-betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment.

-de muizen ondergaan meer ongerief dan verantwoord kan worden voor de doelstelling van het beschreven project, welke door de DEC is gewogen in de huidige projectaanvraag.

Wanneer het humaan eindpunt is bereikt, zal een muis actief uit de studie worden genomen door middel van euthanasie. Daarnaast blijven de muizen maximaal 48uur in het experiment.

-(J-3): De verwachte incidentie in WT muizen is 5-10%; de verwachte incidentie in de hIL37tg muizen is 0-5%.

-(K) De mate van ongerief in de experimentele groepen welke LPS injecties krijgen is ingeschat als ernstig. Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien deze het gevolg is van het induceren van sepsis door middel van LPS injecties.

Aan de hand van de hypothese wordt in de hIL37tg muisgroep (40%) een matig niveau van ongerief verwacht ten opzichte van de wild type controle muizen (ernstig; 40%).

De mate van ongerief in de controle groepen wordt ingeschat als mild (20%), aangezien deze muizen geen sepsis zullen ontwikkelen.

Bijlage 2 (DAP2):

- Ook voor DAP2 zijn de velden aangepast met betrekking tot 'gekozen sexe' (B), 'welzijnsgevolgen' (D-2 en I), 'humaan eindpunt en incidentie' (J-2/3) en (K).

-(A) De groepen 1-1 (vehicle+saline), 1-2 (vehicle+recombinant IL37) en 1-3 (vehicle+ EPO) dienen ervoor om de individuele basale effecten van het toegediende IL37 en EPO te karakteriseren. De toegediende componenten kunnen namelijk al een basaal effect teweeg brengen op bijvoorbeeld functionele parameters en/of inflammatoire markers (gen expressie

levels en/of basale cytokine waarden, infiltratie van inflammatoire cellen in nierweefsel). Om een gedegen uitspraak te kunnen doen over de effectieve (beschermende) gevolgen van recombinant IL37 en/of EPO toediening tijdens het ontwikkelen van sepsis en daaropvolgend acuut nierfalen, dienen we ook deze basale effecten in kaart te brengen. IL37 en EPO signaleren en functioneren beiden via andere signaleringscascades, zodat het niet mogelijk is om deze te combineren in één controlegroep. Groep 1-1 fungeert als de basale controle groep.

Naar onze inschatting zal er in de 3 controle groepen minder spreiding in de uitleesparameters optreden in vergelijking met de resultaten afkomstig uit groepen 2-1, 2-2 en 2-3, welke wel sepsis ontwikkelen. We hebben daarom een wijziging doorgevoerd zodat we voor deze controle groepen in plaats van 15 maximaal 10 muizen/groep benodigd denken te hebben. Deze veranderingen zijn doorgevoerd in (3-1), (K-1) en 'Table:Animals'.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum:13-10-2015

- Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting

-Het aantal muizen is aangepast in de bijlagen, maar nog niet in de NTS. De onderzoekers worden verzocht dit alsnog te doen.

- Datum antwoord: 15-10-2015

- Strekking van de antwoorden:

Niet technische-samenvatting:

-Naar aanleiding van deze opmerking zijn voor zowel paragraaf (3.3) en (4.2) in de NTS de wijzigingen doorgevoerd, en zodoende de correcte hoeveelheid te gebruiken muizen weergegeven (n=225 muizen totaal; n=75 muizen in deelproject B).

- 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 'het bestuderen van de functionele contributie en de therapeutische potentie van het ontstekingsremmend eiwit IL37 in sepsis-gemedieerd AKI.' De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken wat de rol is van endogeen IL37 tijdens sepsis en het daaropvolgend acuut nierfalen bij muizen. Voorts zal duidelijk worden of toediening van IL37 (dus exogeen IL37) de nierschade door sepsis bij muizen kan verminderen. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapieën om acuut nierfalen door sepsis te voorkomen. Acuut nierfalen komt frequent voor bij mensen die zijn opgenomen in een ziekenhuis, en wordt voornamelijk veroorzaakt door sepsis. Het is aannemelijk dat meer inzicht in de moleculaire en cellulaire mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan van acuut nierfalen door sepsis bij muizen zal bijdragen aan de ontwikkeling van therapeutische interventies. De commissie heeft gediscussieerd over de predictieve validiteit van het gebruikte model. De antwoorden van de onderzoeker op de vragen die de commissie hierover heeft gesteld, hebben de commissie voldoende overtuigd. Op dit moment is er geen effectieve behandeling van sepsis-gemedieerd acuut nierfalen, waardoor de helft van de patiënten hier op korte of langere termijn aan overlijdt. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere therapieën voor sepsis-gemedieerd nierfalen, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen. De DEC acht het belang van die doelstelling substantieel.
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 de functie van IL37 in moleculaire en cellulaire mechanismen tijdens sepsis en daaropvolgend acuut nierfalen, en het effect van toediening van IL37 ter preventie van acuut nierfalen door sepsis bij muizen.
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 gevolgen van de intraperitoneale injectie van LPS. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde i.p. of s.c. injecties en het doden onder anesthesie in als licht. Het ongerief als gevolg van de LPS injectie en daarop volgende systemische afweerreactie schat de DEC in als matig voor de muizen die transgeen zijn voor humaan IL37, en ernstig voor de wildtype dieren. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 27% van de dieren, matig voor 40% van de dieren en ernstig voor de overige 33% 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. De onderdelen van dit project die in vitro onderzocht kunnen worden zijn reeds uitgevoerd. Voor de resterende onderdelen is onderzoek met dieren noodzakelijk.
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 het verminderen van het aantal dieren in de controlegroepen, wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.

De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 225 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. Er wordt adequate invulling gegeven aan de extra verzorgingsbehoefte van de zieke dieren. Op verzoek van de commissie krijgen de zieke dieren ook de mogelijkheid op een verwarmde ondergrond te verblijven. 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 bijdrage van IL37 in de moleculaire en cellulaire mechanismen betrokken bij sepsis-gemedieerd acuut nierfalen, en in het effect van toediening van IL37 ter preventie van sepsis-gemedieerd acuut nierfalen bij muizen. Op termijn kunnen deze inzichten bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën om acuut nierfalen door sepsis te voorkomen. Het belang van deze wetenschappelijke inzichten en de ontwikkeling van therapieën voor sepsis-gemedieerd acuut nierfalen acht de DEC substantieel, gezien het frequent optreden van acuut nierfalen door sepsis bij patiënten die zijn opgenomen in een ziekenhuis, en de ernst van deze complicatie.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 27% van de dieren licht ongerief, 40% van de dieren matig ongerief en 33% van de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het sepsismodel 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
 - 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.



16 DEC. 2015

Avis 103002015348

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.	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>	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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> 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

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 14 . 01 . 2016

Einddatum 14 . 01 . 2021

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Het gebruik van GAT-Patch om te zorgen voor snellere bloedstolling bij operaties

- 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

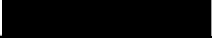
6 Ondertekening


- 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:

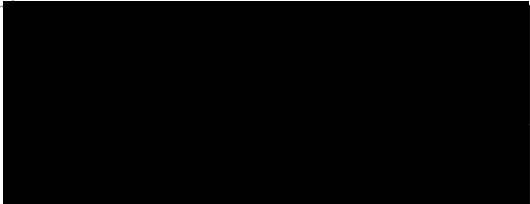
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 14 - 12 - 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.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'.	10300
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3 Provide the title of the project.	Het gebruik van ████████ als hemostatische sealant tijdens operaties

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 or 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.

Operaties en traumata kunnen bloedende oppervlakten veroorzaken die door het diffuse karakter moeilijk te stoppen zijn met hechtingen, klemmen, elektrische coagulatie of druk van buitenaf. Verhoogd bloedverlies en nabloedingen **zorgen voor een langere operatie- en opnameduur en veroorzaken bovendien** ernstige complicaties zoals shock, multi-orgaanfalen, hartinfarct of overlijden (Kishi, Abdalla et al. 2009, Hilal, Underwood et al. 2010). Omdat tamponerende gazen bij bloedingen in de buik- en borstholte geen langdurige oplossing bieden wordt er in de buik- en borstholte gebruikt gemaakt van hemostatische sealants of patches (Öllinger, Mihaljevic et al. 2013, Hanna, Martinie et al. 2014). Dit zijn producten in de vorm van een spray die een laagje stollingsfactoren aanbrengt of in de vorm van een platte spons bestaande uit een basis van (dierlijk) collageen of gelatine. Collageen activeert bloedplaatjes en zet daarmee de eerste fase van bloedstolling in gang ('passieve stolling'). Een voorbeeld van een collageenspons is Hemotese®. Sommige producten () voegen extra componenten, zoals fibrinogeen of thrombine, toe aan de spons om actief de bloedstolling te bevorderen. Omdat de productie van zulke humane fibrinecomponenten erg kostbaar is, zijn ook de eindproducten erg duur. Deze producten, , zijn daarom alleen in kleine formaten te verkrijgen en worden in de kliniek met grote terughoudendheid gebruikt. **Desondanks wordt er wereldwijd jaarlijks voor bijna 150 miljoen dollar aan verbruikt, wat neerkomt op zo'n 400.000 tot 1.000.000 stuks. Dit is een indicatie van de frequentie waarin 1 soort patch wordt gebruikt. wordt in de buikchirurgie vooral gebruikt bij leverresecties.**

In totaal worden er wereldwijd per jaar ruim 250 miljoen chirurgische ingrepen gedaan, waarbij ernstige bloedingen kunnen optreden (Weiser et al, Lancet 2008). Ze worden onder andere vaker gezien bij operaties aan de lever en bij traumatische of chirurgische letsels van de milt. Het aantal leverresecties is moeilijk te bepalen, maar gezien de wereldwijde incidentie van primaire leverkanker (rond 1 miljoen) en leveruitzaaiingen van borst-, long- of darmkanker (>1 miljoen), wordt het aantal hoog ingeschat (cancer.org). Bij leverresecties varieert het bloedverlies van 500-2500ml en heeft zo'n 25% van de patiënten bloedtransfusie nodig. Verder is fors bloedverlies vaak een reden om een kijkoperatie te converteren naar een open buik operatie, en is het in sommige studies geassocieerd met een mortaliteit van 23-46% (Romano et al., HPB Surgery 2012; Hilal et al. J Gastroint Surg 2011; Belghiti et al., JACS 2000).

Miltletsels worden gezien bij een kwart van de stompe buiktrauma's in traumaziekenhuizen, maar vaak is hier geen chirurgische behandeling voor nodig. Dit is vaak wel het geval bij een chirurgisch letsel van de milt, wat onder andere kan optreden bij operaties aan maag, darmen, alveesklier en nier. Helaas worden miltblodingen die tijdens de operatie behandeld worden vaak niet vermeld in wetenschappelijke publicaties maar het aantal wordt geschat op 5-10%. Bij deze kleinere miltblodingen worden hemostatische producten vrijwel altijd toegepast omdat andere technieken om deze miltblodingen te stoppen falen.

In het kader van een Europees onderzoeksproject (EFRO) is er een nieuw polymeer ontwikkeld dat gebruikt kan worden om collageensponzen mee te bedekken om te zorgen voor effectievere hemostase dan de collageenspons alleen. Dit polymeer bestaat uit een basis van [REDACTED] waaraan meerdere *N*-hydroxysuccinimide (NHS)-groepen zijn gekoppeld. Deze NHS groepen binden aan de NH₂ groepen van eiwitten in het bloed en eiwitten op organen waardoor de stolling op gang kan komen. In deze aanvraag is het polymeer afgekort tot POx-NHS. Met *in vitro* en *ex vivo* experimenten is aangetoond dat POX-NHS zorgt voor stolling (gelvorming) van zowel Bovine Serum Albumine (BSA) als gehepariniseerd bloed en heeft een werking onafhankelijk van diersoort en stollingscascade. Door een kale collageenspons te coaten met POX-NHS is er een hemostatische patch gemaakt, welke in deze projectaanvraag verder zal worden aangeduid als [REDACTED]

Verhoogd bloedverlies en nabloedingen zorgen voor ernstige complicaties zoals shock, multi-orgaanfalen, hartinfarct of overlijden en dragen bij aan een langere operatie- en opnameduur.

De theoretische voordelen van [REDACTED] boven bestaande producten zijn een vermindering van het bloedverlies en de daaraan gerelateerde complicaties door:

- 1. Een betere hechting aan orgaan oppervlakten zodat het product beter op zijn plaats blijft en tegendruk kan geven bij een bloeding**
- 2. Het vormen van een gel bij contact met bloed, waardoor de bloeding sneller stopt dan bij 'passieve' stolling**

Daarnaast is het een synthetisch product om actieve stolling te bewerkstelligen, met een eenvoudiger productieproces, waardoor het uiteindelijke product 5 tot 10 maal goedkoper wordt dan bestaande producten. Omdat [REDACTED] synthetische bestanddelen gebruikt om actieve stolling te bewerkstelligen is het bovendien niet nodig om gebruik te maken van bloeddonaties om humaan fibrinogeen en thrombine te verkrijgen, zoals bij [REDACTED] wel het geval is.

[REDACTED] is in de ontwikkelfase en op dit moment zijn er meerdere prototypes. Deze verschillen van elkaar met betrekking tot de precieze samenstelling van de actieve component [REDACTED] derivaat). Sommige hebben bijvoorbeeld een hoger percentage plakkende NHS-groepen. Andere hebben door gebruik van andere zijketens een meer hydrofiel, dan wel hydrofoob, karakter. Aan de hand van *ex vivo* testen, waarin we de sterkte van de hechting met bloed hebben getest, hebben we een eerste selectie van prototypes gemaakt. Lopende *in vitro* en *ex vivo* experimenten moeten deze selectie nog verder optimaliseren, en zo mogelijk verkleinen.

In het huidige projectvoorstel gaan we verder met de volgende stap, waarin wordt onderzocht welke van de prototypes van [REDACTED] het beste functioneert als er een actieve bloeding is in de buikholte. Hierbij spelen factoren mee zoals bloeddruk, stolling, temperatuur, ademhalingsbewegingen, peristaltiek van darmen in de buurt en inflammatoire reacties door de aangebrachte schade. Hiervoor is het nodig om gebruik te maken van levende proefdieren. Daarnaast willen we onderzoeken hoe effectief [REDACTED] is in vergelijking met bestaande producten, hoe lang het in het lichaam aanwezig blijft en of het product ongewenste bijwerkingen heeft. **Ook willen we bestuderen of het gebruik van [REDACTED] veilig is in een geïnfecteerde omgeving, omdat er bij buikoperaties sprake kan zijn van bacteriële contaminatie en infecties hardnekkiger kunnen verlopen als er vreemdlichaam ([REDACTED] materiaal aanwezig is.** We hebben het project opgedeeld in verschillende onderdelen welke **hieronder staan vermeld en die** verder worden beschreven onder 3.4 Onderzoeksstrategie.

1. Hemostase model rat

a. Pilot hemostase model

Er zullen drie modellen voor hemostase van leverbloedingen worden getest en gevalideerd, zodat de meest geschikte kan worden gebruikt in de volgende experimenten. De drie modellen betreffen verschillende methodes om een bloeding te induceren: dikke naaldpunctie, biopsie laesie en verwijderen stukje lever.

b. Prototypeselectie en 'proof of principle'

Een geschat aantal van 6-12 prototypes zal worden getest op hun werking en de interactie met orgaanweefsel. Het meest geschikte prototype zal worden geselecteerd en vervolgens worden gebruikt in de rest van het project.

2. Hemostase model varken

a. Pilot hemostase model

Een model voor lever- en miltbloedingen zal opgezet worden in varkens. Het model betreft het aanbrengen van meerdere bloedingslaesies op de lever en milt van ieder varken, waarop vervolgens de patches (of controles) worden aangebracht. Eventueel wordt er een tweede dier gebruikt, vooraf behandeld met heparine, als de laesies in het eerste dier niet voldoende voldoende bloeden.

b. Veiligheid en Effectiviteit

Het meest geschikte prototype van () zal worden getest op het bereiken en behouden van hemostase (effectiviteit). Daarbij zal de werking worden vergeleken met bestaande producten. Na verschillende termijnen zal een tussentijdse inspectie met laparoscopie worden gedaan, waarbij ook de werking bij laparoscopie wordt bestudeerd. Vervolgens zullen dieren na verschillende termijnen worden opgeofferd; het optreden van complicaties (veiligheid) wordt bestudeerd en weefsels en vloeistoffen worden geanalyseerd op (verstoringen van de) genezing.

3. Afbraak en langetermijneffecten rat

In een rattenmodel zullen de afbraaksnelheid en afbraakreacties worden onderzocht. Hiervoor zullen lange termijn experimenten (<3 maanden) worden gebruikt.

4. Veiligheid bij contaminatie rat

Er zal worden onderzocht wat de gevolgen zijn van het gebruik van () als er sprake is van contaminatie, door gebruik te maken van een rattenmodel waarbij de buikholte wordt gecontamineerd (d.m.v. 'Cecal Ligation Puncture' of inoculatie met bacteriële/fecale suspensie).

5. Ernstige bloedingen varken

In een non-survival model zullen meerdere ernstigere bloedingen van solide organen (lever/nier/milt), sacrale veneuze plexus en slagaderen vaten worden gemaakt, om de effectiviteit van () hiervoor te testen.

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?

Samenvattend is het doel van dit project om te onderzoeken of [REDACTED] een nieuwe, goedkope, grotendeels synthetische, hemostatische patch, effectief en veilig is voor bloedingen in de buikholte waarbij reguliere en eenvoudige behandelmethodes (hechting, electrocoagulatie) minder effectief of niet mogelijk zijn.

Haalbaarheid

Binnen [REDACTED] is er veel ervaring met buikoperaties bij ratten en varkens, dus ook veel ervaring met de benodigde zorg rondom de operaties. **Daarom verwachten we geen problemen met de logistieke uitvoer van de experimenten.** Er is nog weinig ervaring met de geplande diermodellen voor het gebruik van hemostatische patches. **Om die reden hebben we zowel voor het rattenmodel als het varkensmodel pilotexperimenten ingebouwd om de modellen te oefenen en valideren. Op basis van onze ruime ervaring met buikoperaties bij ratten en voorbereidende testen met dode ratten, schatten we in dat de rattenexperimenten goed haalbaar zijn.**

Er is een centrum in [REDACTED] bezocht om mee te kijken bij een varkensmodel voor hemostase. In [REDACTED] worden kale collageensponsen gemaakt en op verkennende wijze getest. Door mee te kijken met het model bij een varken hebben we een goede indruk gekregen van de uitvoering en haalbaarheid van de proef. Wel denken we dat het nog nodig is om pilotstudies te doen om de geplande diermodellen te oefenen en intern te valideren. Uit onze contacten met [REDACTED] weten we dat ons gepland onderzoek geen onnodige herhaling is. Bovendien is het onderzoek in [REDACTED] 'marketing driven' en worden experimenten daar niet met een wetenschappelijke vraagstelling uitgevoerd. Vanwege de goede in vitro resultaten waarin we zelfs een effect hebben gezien met gehepariniseerd bloed (geblokkeerde bloedstolling) zijn we optimistisch over de kans op effectiviteit van het biomateriaal.

3.3 Relevance

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

Het medisch en maatschappelijk belang van het huidige project omvat het verbeteren van de klinische uitkomst van chirurgische ingrepen en traumatische letsels van solide organen en andere structuren in de buik- en bekkenholte, door het verminderen van de hoeveelheid bloedverlies en benodigde transfusies, verkorten van de operatieduur, het terugdringen van het aantal postoperatieve complicaties in relatie tot een nabloeding, het verkorten van de opnameduur en terugdringen van de (ziekenhuis)kosten. Omdat het product geen gebruik maakt van humane componenten is de kans op overdracht van bijvoorbeeld virussen met dit product nihil. Omdat het uiteindelijke product vele malen goedkoper zal zijn dan bestaande producten wordt een bijdrage geleverd aan de beheersing van zorgkosten. Het product is ook een stap voorwaarts in de richting van een volledig synthetisch, niet humaan en niet dierlijk, hemostatisch product wat past in de maatschappelijke visie om geen dieren en mensen meer te gebruiken voor biomaterialen. Door vergelijken van in vitro testen met perfusiemodellen en de dierproeven kan worden beoordeeld of deze in vitro modellen in de toekomst (een deel van) de dierproeven kan vervangen.

Daarnaast dient het project een wetenschappelijk belang omdat het de kennis vergroot over een nieuw ontwikkeld materiaal waardoor wellicht andere toepassingsgebieden worden ontdekt.

3.4 Research Strategy

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

Het betreft hier een gefaseerd project, waarbij de volgorde van de experimenten hieronder wordt beschreven. Ter verduidelijking; er wordt pas aan een volgende stap begonnen als de resultaten daartoe aanleiding geven.

1. Hemostase model rat
 - a. *Pilot hemostase model*
 - b. *Prototypeselectie en 'proof of principle'*
2. Hemostase model varken
 - a. *Pilot hemostase model*
 - b. *Veiligheid en Effectiviteit*
3. Afbraak en langetermijneffecten rat
4. Veiligheid bij contaminatie rat
5. Ernstige bloedingen varken

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.

De doelen van dit project per onderdeel zijn:

1.Hemostase model rat

a.Pilot hemostase model

Opzetten van een hemostase model in de rat (lever), omdat de geschiktheid van het model voor het testen van ██████ nog uitgezocht moet worden en er nog geen ervaring mee is binnen onze afdeling. Een rattenmodel is voor deze fase geschikt vanwege de grootte van het proefdier en de grotendeels overeenkomende stollingscascade.

***b.Prototypeselectie en 'proof of principle'* Bepalen welk prototype van ██████ het meest geschikt is met betrekking tot tijd tot hemostase en hoeveelheid bloedverlies en onderzoeken welke (vreemd lichaam) reacties deze veroorzaakt na aanbrengen op weefsel. De prototypes verschillen in samenstelling en hoeveelheid van het actieve polymeer, waardoor zowel de effectiviteit als de interactie met lichaamsweefsel anders kunnen zijn. **Verschil in deze groepen vertaalt zich naar verschil in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, en de mate van absorptie. We zijn bij de in vitro testen op zoek naar de prototypes met de meest optimale verhouding van deze 3 eigenschappen.** We verwachten op basis van ervaringen met verscheidene andere geteste biomaterialen dat de soort (vreemd lichaam) reactie in de rat representatief is voor de mens.**

2.Hemostase model varken

a. Pilot hemostase model

Opzetten van hemostasemodel in varken, zodat er tijdens de vervolgebperimenten onder 2b geen sprake meer is van leercurve en de kans op onvoorziene omstandigheden zo klein mogelijk is. We gebruiken hier een varkensmodel omdat de anatomie, grootte en fysiologie van de organen(systemen) en de significantie van de bloedingen van bijvoorbeeld een beschadigd lever of milt oppervlak lijken op die van de mens. De stollingsmechanismen lijken ook op elkaar.

b. Veiligheid en Effectiviteit

Bepalen of effectieve en veilige hemostase kan worden bereikt en de effectiviteit van [REDACTED] vergelijken met bestaande producten. We willen [REDACTED] vergelijken met kale collageensponzen om de aanvullende waarde van het polymeer te onderzoeken, met andere NHS-gecoate collageensponzen [REDACTED] met PEG-NHS) om de aanvullende waarde van de POX-NHS formule te bepalen, en met de 'fibrinogeenspons' [REDACTED] omdat deze, op dit moment geldt, als gouden standaard in de buikchirurgie.

Daarnaast willen we het laparoscopische gebruik van [REDACTED] bestuderen. Deze keuze wordt gemaakt omdat steeds meer buikoperaties laparoscopisch worden uitgevoerd en het moeilijker kan zijn om bloedingen tijdens scopische ingrepen te stoppen en de omstandigheden tijdens laparoscopie (gebruik van CO2 gas en verhoogde buikdruk) de hemostase en daarmee de werking van de [REDACTED] kunnen beïnvloeden. Tenslotte zal in dit onderdeel ook de lange termijn veiligheid worden bestudeerd.

3. Afbraak en langetermijneffecten rat

Nauwkeurig bepalen wat de afbraaksnelheid, afbraakreacties en eliminatie uit het lichaam van het product zijn, en de spreiding hierin. Van de 'kale' collageenspons is bekend dat deze gemiddeld binnen 8 weken is afgebroken zonder nadelige reactie. [REDACTED] bestaat qua moleculair gewicht grotendeels uit de POX-NHS polymeer dus er kan niet worden 'gevaren' op de gegevens van de 'kale' spons. De polymeer bestaat uit afbreekbare componenten, waarvan afzonderlijk geen nadelige effecten bekend zijn. Het is nog onbekend hoe de gehele polymeer zich gedraagt en in combinatie met een collageenspons tijdens deze afbraak en eliminatie periode.

4. Veiligheid bij contaminatie rat

Bepalen of gebruik van [REDACTED] veilig is als er sprake is van contaminatie.

Bij operaties in de buikholte aan de darmen (wat zeer frequente operaties zijn) is er sprake van contaminatie. Bij aanwezigheid van bloed(stolsels) en vreemd lichaamsmateriaal kan contaminatie sneller tot een infectie leiden die ook een ernstiger beloop hebben dan zonder vreemd lichaam en de effectiviteit van het materiaal teniet kan doen. Vanwege de potentiële toepassing in een gecontamineerde omgeving moet [REDACTED] hierop worden onderzocht.

5. Ernstige bloedingen varken

Omdat het gebruik van [REDACTED] ook bij ernstige bloedingen erg waardevol kan zijn en zich kan onderscheiden van bestaande middelen wordt [REDACTED] in deze situaties bestudeerd. Voorbeelden van situaties/ingrepen met ernstige bloedingen zijn:

- Leverresecties met grote wondoppervlakten. Deze ingrepen nemen in frequentie toe en worden ook vaker herhaald gedaan bij dezelfde patiënt in verband met uitzaaiingen van darmkanker.
- Miltletsels met groter wondoppervlak: dit kan optreden bij stompe buiktrauma's en als complicatie bij buikoperaties. Vanwege aanhoudende bloedingen moet een miltverwijdering worden gedaan wat onwenselijk is in verband met de miltfunctie bij de afweer.
- Nierresecties: vooral partiële nierresecties ivm niertumoren.
- Sacrale veneuze plexus letsels: moeilijke te stoppen bloedingen die in veel situaties kan voorkomen (o.a. bekkenfractuur, endeldarm-,baarmoeder en prostaatoperaties)
- Slagaderlijke bloedingen: meer verkennend zal er worden gekeken naar de toepassing van [REDACTED] bij bloedingen uit slagaderen (hogere druk). Andere producten falen in deze omstandigheden. Het hechten van deze bloedingen is soms moeilijk (dieper gelegen

structuren) en kan leiden tot vernauwingen en occlusie van het bloedvat. Met een weefsel plakkende patch van buitenaf op het vat zou een vernauwing en occlusie kunnen worden voorkomen.

Aangezien de keuze voor een of meerdere van deze toepassingen aan het einde van het project pas duidelijk worden, wordt dan ook pas bepaald in hoeverre onderdeel uitgevoerd zal gaan worden.

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 het pilot deel van dierproef 1 zal worden gestart met groepen P1 en P2 omdat we verwachten dat deze methodes het meest geschikt zijn. Pas als blijkt dat het bloedverlies in deze groepen te groot is, zal de naaldpunctie methode in groep P3 worden getest. Verder worden in onderdeel b van dierproef 1 eerst de subgroepen gedaan met opoffering op dag 1. Zo kan al een goede eerste indruk worden verkregen van de effectiviteit en weefselreacties. Als het prototype goed lijkt te functioneren en terug te vinden is op de laesie, zullen ook de experimenten met de andere subgroepen uitgevoerd worden.

Als uit de experimenten in dierproef 1 blijkt dat het coaten van de collageenspons leidt tot een verbeterde effectiviteit en er geen grote complicaties (zoals forse ontstekingsreacties of abscesvorming) optreden, dan zal het beste [REDACTED] prototype worden uitgekozen en zal hiermee verder worden in dierproef 2. Als uit dierproef 2 blijkt dat [REDACTED] ook in een groot proefdier werkt en qua effectiviteit minimaal gelijkwaardig is aan bestaande producten, zullen we verder gaan met dierproef 3 en 5. De contaminatie experimenten in dierproef 4 zullen pas worden gestart nadat de lange termijn effecten in dierproef 3 zijn onderzocht en hierbij geen ernstige complicaties zijn opgetreden.

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 Hemostasemodel rat
2	3.4.4.2 Hemostasemodel varken
3	3.4.4.3 Afbraak en langetermijneffecten rat
4	3.4.4.4 Veiligheid bij contaminatie rat
5	3.4.4.5 Ernstige bloedingen 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.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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure 3.4.4.1 Hemostasemodel 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:

a. *Pilot hemostasemodel*

- Opzetten van een hemostasemodel in de rat.

b. *Prototypeselectie en proof of principle*

- Bepalen of hemostase kan worden bereikt met ██████████
- Onderzoeken welke (vreemdlichaam) reacties ██████████ veroorzaakt bij aanbrengen op orgaanweefsel.
- Bepalen welk prototype van ██████████ het meest geschikt is.

In het huidige onderdeel zullen we gebruik maken van een rattenmodel waarbij er een bloeding van de lever wordt geïnduceerd die vervolgens met een patch behandeld zal worden. We hebben een systematische search gedaan naar modellen voor hemostatische producten. Hieruit bleek dat er varkens, honden, konijnen, ratten en muizen worden gebruikt, en dat er verschillende methodes worden beschreven voor het induceren van bloedingen en voor het scoren van hemostase. Het aantal gepubliceerde dierstudies was te klein, en de variatie tussen de modellen te groot, om op systematische wijze uit te zoeken welk model het meest geschikt is.

De redenen dat we voor een rattenmodel met leverbloeding hebben gekozen zijn:

- **Het bereiken van hemostase van leverbloedingen is de belangrijkste toepassing van ██████████. Daarom gebruiken we in deze fase geen milt- of nierletsels." Bovendien zijn milt en nier bij ratten dermate klein dat er onvoldoende ruimte is om de patch met een adequate marge rondom een bloeding te positioneren. Het gebruik bij miltletsels zal onderzocht worden met een varkensmodel in dierproef 3.4.4.2. Onderzoek van miltletsel is klinisch relevant omdat de milt het meest voorkomende orgaan is dat wordt beschadigd bij een stomp buiktrauma (auto-, fiets-, sportongeval)**

- Onze afdeling heeft het meeste ervaring met buikoperaties bij ratten.

- Uit *ex vivo* proeven is gebleken dat de afmeting van een rattenlever geschikt is voor het aanbrengen van kleine stukjes ██████████. Bij gebruik van muizenlevers zouden de afmetingen van ██████████ teveel moeten worden verkleind **zodat er onvoldoende overlap van de patch rondom de bloeding is en er daardoor te weinig ruimte is voor de relatief te grote patch goed te positioneren.**

- Omdat het doel van dit onderdeel is om de effectiviteit en weefselreacties van de prototypes te verkennen, en niet om de resultaten direct te vertalen naar de mens, verkiezen we in dit onderdeel de praktische kant van een klein proefdier boven de translationele waarde van grote proefdieren (varkens).

Omdat er meerdere methodes bestaan om leverbloedingen te induceren, en het nog niet duidelijk is welke hiervan het meest geschikt is, zullen we eerst een pilot experiment uitvoeren waarin we deze methodes testen. De geschiktheid hangt onder andere af van de tijd tot hemostase en de hoeveelheid bloedverlies bij gebruik van hemostatische sponzen. Deze zijn niet goed te herleiden uit de beschikbare literatuur. Het bloedverlies moet

dusdanig veel zijn dat er door aanbrengen van kale collageensponsen niet te snel hemostase optreedt. Echter, het moet wel reëel zijn om hemostase te kunnen bereiken binnen enkele minuten.

De drie methodes om de bloeding te induceren die we zullen testen zijn:

1. Verwijderen stukje lever. Lijkt meer op kliniek bij leverresecties en waarschijnlijk voldoende bloedverlies, maar moeilijk om te standaardiseren (Schmiedt, Köhler et al. 2012).
2. Biopsie laesie. Goed te standaardiseren en praktische grootte van bloeding, maar niet eerder beschreven in literatuur.

We beginnen eerst met deze twee methoden, mocht blijken dat er te toch teveel bloedverlies ontstaat, dan testen we de volgende:

3. Naaldpunctie. Goed te standaardiseren, **klinisch relevant voor een peroperatieve naald biopsie van de lever bij diagnostiek naar diepe leverafwijkingen en tumoren**, mogelijk gering bloedverlies. (Murakami, Yokoyama et al. 2008)

Planning experimentele opzet/groepen:

a. Pilot hemostasemodel

Bij alle dieren zullen er minimaal twee leverletsels worden aangebracht; indien de grootte van de lever en het bloedverlies het toelaat, zullen er meerdere laesies worden aangebracht. Om te bepalen welke methode het meest geschikt is zullen we gebruik maken van de volgende groepen laesies:

Groep P1: verwijderen stukje lever. Transversale resectie 3-5mm van de onderrand van de leverkwab, behandeling met kale collageenspons (P1a) of [REDACTED]

Groep P2: biopsie laesie. Met ronde biopsie punch, behandeling met kale collageenspons (P2a) of [REDACTED] (P2b)

Groep P3: naaldpunctie. Punctie met holle injectienaald, behandeling met kale collageenspons (P3a) of [REDACTED] (P3b)

Elke groep **in de pilot** zal dus worden onderverdeeld in de volgende subgroepen:

- a: aanbrengen van kale collageensponsen (negatieve controle)
- b: aanbrengen van [REDACTED] ('positieve' controle).

Als primaire uitkomsten zal de tijd tot hemostase en de hoeveelheid bloedverlies worden bepaald. Het model waarbij een dusdanige bloeding optreedt zodat we het product voldoende kunnen testen zonder dat het dier lijdt aan teveel (**>1.5mL of >10% van circulerend volume**) bloedverlies, zullen wij in de vervolggroepen gaan gebruiken. Na de interventies zal het dier, terwijl het nog onder narcose is, worden gedood door verbloeding en cervicale dislocatie.

b. Prototypeselectie en proof of principle

Afhankelijk van de pilot resultaten zal de meest geschikte 'leverletsel-methode' in deze experimenten worden gebruikt. Per groep zal er een verschillend prototype van [REDACTED] of een controleproduct worden getest. De primaire uitkomsten zijn de hoeveelheid bloedverlies en de tijd tot het bereiken van hemostase. Na het bereiken van hemostase zal de buik worden gesloten. **Als secundaire uitkomst zal worden gekeken naar de weefselreacties op korte termijn met behulp van beschrijvende histologie. De dieren zullen op dag 1, 3 of 7 (subgroep a,b,c) worden opgeofferd en na inspectie van de buikholte op eventuele nabloedingen zal er weefsel worden afgenomen.**

Groep 1 (**a,b,c**): controle met gazen, om hoeveelheid bloedverlies nauwkeurig te bepalen (**negatieve controle**)

Groep 2 (a,b,c): controle met ██████████, als referentieproduct*

Groep 3 (a,b,c): controle met kale collageenspons, om meerwaarde van polymeren te bepalen

Groep 4 (a,b,c) - 15 (a,b,c): ██████████-P1-12

Specifieke invulling van prototypes zullen nog nader worden bepaald. **Verschillen tussen de prototypes zitten vooral in verhouding tussen de hoeveelheid ██████████ en NHS groepen en de dichtheid waarmee het polymeer op de collageenspons wordt gezet. Dit uit zich in de verschillende groepen in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, de mate van absorptie.**

*omdat ██████████ (huidige standaard) een dikker is dan ██████████ en daarnaast minder flexibel en aanzienlijk duurder is, achten wij het minder geschikt om als controleproduct te gebruiken in dit rattenmodel. In dierproef 2 (varkensmodel) zal het wel gebruikt worden als controleproduct.

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

Zie ook antwoord 2A.1. Samengevat zullen in dit onderdeel de volgende (be)handelingen worden verricht.

1. Wegen/observatie: dagelijks ter monitoring van welzijn en ter bepalen injectievolume pijnstilling
2. Subcutane injectie met buprenorphine: pre- en postoperatief 2x/dag gedurende 48 uur ter pijnstilling
3. Anesthesie met isofluraan: gedurende 30-60 minuten als narcose voor de operatie
4. Staartvenepunctie: pre- en postoperatief ter verkrijgen van bloed voor bepalen stollingswaarden
5. Laparotomie met induceren van tenminste twee leverbloedingen per rat + aanbrengen hemostatische patch als experimentele interventie van dit experiment. In experiment b zullen de dieren voor het eind van de operatie ook extra vocht toegediend krijgen ter compensatie van het bloed- en vochtverlies tijdens de operatie.
6. Observatie hemostase
7. Ofwel opoffering onder narcose in de pilotgroepen (experiment a) OF relaparotomie na 1, 3 of 7 dagen na de operatie (experiment b), zodat de effectiviteit en weefselreacties op de korte termijn kunnen worden bepaald. De dieren worden dan aan het eind van de operatie geofferd. Deze tijdpunten zijn gekozen om te inventariseren of er eventuele kleine nabloedingen optreden en wanneer dit gebeurt. Deze kleine bloedingen kunnen ontstaan door onvoldoende stabiliteit in de initiële stolsels.

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

De voorlopige berekening voor het benodigde aantal testen per sample is verwerkt in onderdeel B1.

Door het gebruik van een pilot experiment kan het juiste model gekozen worden, en kan de groepsgrootte voor de daarop volgende experimenten beter worden bepaald. In het pilot deel zal worden gestart met groepen P1 en P2 omdat we verwachten dat deze methodes het meest geschikt zijn. Pas als blijkt dat het bloedverlies in deze groepen teveel is, zal de naaldpunctie methode in groep P3 worden getest

In onderdeel b zullen de prototypes die uit de in vitro / ex vivo experimenten de meest veelbelovende resultaten lieten zien, gebruikt worden. Verder worden in onderdeel b eerst de subgroepen gedaan met opoffering op dag 1. Zo kan al een goede eerste indruk worden verkregen van de effectiviteit en weefselreacties. Als het prototype goed lijkt te functioneren en terug te vinden is op de laesie, zullen ook de andere subgroepen gedaan worden.

B. The animals

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

Soort: Rat
Ras: Wu (Wistar)
Geslacht: beide
Leeftijd: adult
Herkomst: registered EU breeder

Geschatte aantallen

a Pilot

Groepen:
Groep P1a/b: verwijderen stukje lever. Behandeling met kale collageenspons/ [redacted]
Groep P2a/b: biopsie laesie. Behandeling met kale collageenspons [redacted]
Groep P3a/b: naaldpunctie. Behandeling met kale collageenspons [redacted]
Totaal aantal groepen: 6
Aantal laesies per groep: 6 (+4*)
Gemiddelde aantal dieren per groep: 5
Subtotaal aantal dieren voor pilot: 30

* Per dier kunnen minimaal 2 laesies gemaakt worden. Per groep schatten we 6 laesies nodig te hebben (dus 3 dieren) nodig te hebben om een goede indruk van de krijgen van de tijd tot hemostase (Schmiedt, Köhler et al. 2012). Omdat er sprake zal zijn van een leercurve en onvoorziene omstandigheden, schatten we per groep vier extra laesies (twee dieren) nodig te hebben.

b Prototype selection

Groepen:
Groep 1 (**a,b,c**): controle met gazen, om hoeveelheid bloedverlies nauwkeurig te bepalen (**negatieve controle**)

Groep 2 (a,b,c): controle met ██████████, als referentieproduct

Groep 3 (a,b,c): controle met kale collageenspons, om meerwaarde van polymeren te bepalen

Groep 4 (a,b,c) - 15 (a,b,c): ██████████-12

De groepsgrootte zal door middel van een powerberekening worden bepaald. Daarbij zal gebruik gemaakt worden van sample size calculator op: <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>.

De benodigde sample size zal worden berekend om te bepalen of het ██████████-prototype (groep 4-15) zorgt voor een significant snellere hemostase ten opzichte van de huidige standaard (groep 2). Omdat daarnaast ook zal worden vergeleken met groep 3, wordt er een bonferroni correctie toegepast voor 3 vergelijkingen. Omdat groep 1 enkel wordt gebruikt als negatieve controle, zal hiervoor niet worden gecorrigeerd. Ook wordt er per prototype niet verder gecorrigeerd voor de mogelijke extra vergelijkingen, omdat de vergelijking met de gouden standaard de belangrijkste blijft.

Benodigde sample size per groep: 18 laesies (+2*)

Totaal aantal voor 15 groepen: 300 laesies

Totaal aantal benodigde dieren: 150

* Rekening houdend met uitval en onvoorziene omstandigheden schatten we per groep twee extra laesies (een dier) nodig te hebben

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat, wistar	Registerd EU breeder	180	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.

Vervanging& vermindering

In de ontwikkelingsfase van ██████ is gebruik gemaakt van *in vitro* en *ex vivo* experimenten (o.a. met bloed van mensen en ratten) om tientallen prototypes te testen en hun effectiviteit in te schatten. Daarmee is het gebruik van proefdieren voor dit doel vermeden.

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 en ratten in de volgende onderdelen.

Verder wordt het aantal proefdieren beperkt doordat er meerdere laesies per dier worden aangebracht.

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.

Zie punt 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.

N.V.T.

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?

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.

Voor (gas)anesthesie wordt gebruikt 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?

In de pilot groepen is er sprake van lichte stress bij het onder narcose brengen van de dieren. Door de concentratie isofluraan bij inslapen op 5% te zetten, wordt gepoogd deze stress te beperken.

In experiment b is er na de buikoperatie 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 er (nat) voedsel in de kooi gelegd en worden er drinkflessen met lange tuiten geplaatst om het eten en drinken te vergemakkelijken. **Na twee tot drie dagen zal de klinische conditie van de ratten genormaliseerd zijn, dat zich uit in een herstellend gewicht en activiteiten patroon.**

Verder worden dieren post-operatief in tweetallen gehuisvest, en worden alle procedures door ervaren mensen uitgevoerd.

Omdat er tijdens de operatie leverletsel wordt aangebracht, bestaat er een theoretische kans op een nabloedingen. We schatten deze kans in als zeer laag (<5%), omdat de operatie pas wordt beëindigd als er adequate stolling is opgetreden. Mocht er toch een nabloeding ontstaan, dan zou dit kunnen resulteren in buikpijn en darmobstructie (door stoppen van peristaltiek), en bij ernstig bloedverlies kan het dier in shock raken of overlijden. Verder bestaat er een kleine (<5%) kans op ontstekingen en verklevingen, die eventueel ook ongerief met zich mee kunnen brengen.

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 verslechterde conditie of verdenking op peritonitis of nabloeding, af te meten aan uiterlijke kenmerken zoals sterk verminderde activiteit, bolle rug, opstaande haren en brilogen, ingevallen of juist bolle buik. 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 postoperatieve complicaties door het leverletsel 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).

In de pilot groepen (17%): terminaal

In de interventie groepen (83%): matig (obv bijkomen van buikoperatie).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

L. Method of killing

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 GAT-P en de buikorganen. Hiervoor moeten de dieren opnieuw geopereerd worden. Daarnaast hebben we zowel het bloed als het lever/huidweefsel 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.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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>3.4.4.2 Hemostasemodel varken</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	3.4.4.2 Hemostasemodel varken
Serial number	Type of animal procedure					
2	3.4.4.2 Hemostasemodel 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:

a. Pilot hemostase model

- Opstellen van hemostasemodel in varken

b. Experiment: Veiligheid en effectiviteit

Primaire doelen:

- Bepalen of veilige hemostase kan worden bereikt (hoeveelheid bloedverlies)
- Onderzoeken hoe effectief [REDACTED] is vergeleken met bestaande producten (tijd tot hemostase)
- Bepalen of, en hoe, [REDACTED] laparoscopisch gebruikt kan worden

Secundaire doelen:

- Een indicatie krijgen van de langetermijneffecten

Tertiaire doelen:

- Verkennen van de toepassing bij hoog risicobloedingen

Hiervoor zullen we in dit onderdeel gebruik maken van een varkensmodel waarbij er bloedingen van de lever en milt worden geïnduceerd die vervolgens met een patch behandeld worden. We hebben een systematische search gedaan naar modellen voor hemostatische producten. Hieruit bleek dat er varkens, honden, konijnen, ratten en muizen worden gebruikt, en dat er verschillende methodes worden beschreven voor het induceren van bloedingen en voor het scoren van hemostase. Het aantal gepubliceerde dierstudies was te klein, en de variatie tussen de modellen te groot, om op systematische wijze uit te zoeken welk model het meest geschikt is. De redenen dat we voor een varkensmodel met lever- en miltbloeding hebben gekozen zijn:

- om te bepalen of bij mensen veilige hemostase kan worden bereikt is het nodig dit te testen op orgaanlaesies met een klinisch relevante grootte en anatomie en vergelijkbaar stollingsmechanisme; hiervoor zijn varkensorganen geschikt. **Bij leveroperaties ontstaan er grote bloedende resectievlakken, die voor een groot deel met electrocoagulatie kunnen worden behandeld. Daarbij blijven er echter vaak enkele bloedende plekken over die een kleinere diameter (1-2cm) hebben, maar die wel hardnekkig kunnen blijven bloeden. Bij het behandelen van dergelijke laesies met een patch is er een niet bloedende marge van zo'n 1 cm rondom nodig. Rattenlevers zijn net te klein om patches van 3x3cm (overlap 1 cm bij defect 2 cm) goed te positioneren.**
- Bestaande producten zijn ook met dergelijke modellen getest (Lewis, Schiviz et al. 2014)
- Door de grootte van de milt en lever van varkens kunnen er meerdere samples per dier worden getest. Met name de milt is erg lang bij varkens en daardoor zeer geschikt. **Het gebruik bij miltletsels zal onderzocht worden in dit model, omdat onderzoek van miltletsel klinisch relevant is: de milt is het meest voorkomende orgaan dat wordt beschadigd bij een stomp buiktrauma (auto-, fiets-,**

sportongeval) Het orgaanoppervlak van de milt lijkt bovendien erg veel op dat van andere solide organen, waaronder de lever. Door ook de varkensmilt te gebruiken kan er meer informatie worden verkregen en worden er zo weinig mogelijk dieren gebruikt.

Planning experimentele groepen:

a. *Pilot hemostase model*

Groep P1: Pilot zonder heparine + testen verschillende types laesies

Groep P2: Pilot met heparine + testen verschillende types laesies

Toelichting: In de literatuur zijn modellen beschreven waarbij de dieren worden gehepariniseerd, om de bloedstolling te vertragen. Omdat hier in de kliniek meestal geen sprake van is, vinden wij het relevanter om zonder heparine te testen. Het kan echter zijn dat het bloedverlies zonder heparine niet voldoende is. Daarom willen we het model in deze Pilot zowel met als zonder heparine testen.

Als primaire uitkomsten zal de tijd tot hemostase en de hoeveelheid bloedverlies worden bepaald. Het model waarbij een dusdanige bloeding optreedt, zodat we het product voldoende kunnen testen, zonder dat het dier lijdt aan teveel bloedverlies, zullen wij in de vervolgentoelichting gaan gebruiken.

b. *Veiligheid en effectiviteit*

Groep 1: ██████████ (huidige 'gouden standaard')

Groep 2: ██████████ (experimentele groep)

Groep 3: ██████████ (extra vergelijking)

Groep 4: kale collageenspons (negatieve controle)

Groep 5: ██████████, eventueel 2e prototype

Toelichting: We gebruiken in groep 1 een 'fibrinogeenspons' (██████████) omdat deze geldt als de huidige standaard. Daarnaast willen we vergelijken met een andere NHS-gecoate collageenspons (██████████ met PEG-NHS; groep 3) om de aanvullende waarde van de (██████████) formule boven de PEG-NHS formule te bepalen. In groep 4 gebruiken we kale collageensponzen om de aanvullende waarde van de polymeer coating te onderzoeken.

Het is de bedoeling om alleen het best werkende prototype van (██████████) in varkens te testen. Het kan zijn dat we ook een tweede prototype willen onderzoeken, omdat de experimenten in deel 1 geen uitsluitsel konden geven, of omdat andere relevante factoren mee spelen. Denk hierbij aan de mogelijkheid dat het ene prototype iets beter werkt, maar het andere bijvoorbeeld makkelijker te produceren is.

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

Tabel 1- Overzicht experimentele opzet

	n=	Dag 0	Dag 1	Dag 3	Week 1	Week 2	Week 4	Week 8	Week 12	
a. Pilot	2	Laparotomie met Hemostase model	Laparoscopie + opofferen							
b. Experiment	4	Laparotomie met Hemostase model	Laparoscopie		Opofferen					
	4			Laparoscopie		Opofferen				
	4					(Laparoscopie)		Opofferen		
	4							(Laparoscopie)	Opofferen	
	4								(Laparoscopie)	Opofferen

Hemostasemodel

Onder algehele narcose (zie protocol onder H3) zal er een laparotomie worden verricht. Daarbij zullen zowel op de milt als op de lever 8-10 laesies (afhankelijk van orgaangrootte) van 1cm diameter worden gemaakt. **Omdat elke laesie meteen behandeld wordt met een patch, de laesies kort achter elkaar worden gemaakt, en de lever en milt parenchymatueze organen zijn waarbij de bloedingen weinig afhankelijk van bloeddrukwisselingen (als gevolg van eerder bloedverlies) zijn, verwachten we niet dat het opgetreden bloedverlies van de eerste laesies van invloed is op de laatst gemaakte laesies. Ook bij het bijgewoonde experiment in [REDACTED] was dit niet het geval. Uiteraard zal dit in het pilot experiment worden gecontroleerd. We verwachten dat het bloedverlies van de laesies onderling wel zal verschillen doordat de onderliggende vaatanatomie per laesie anders is. Dit wordt ondervangen door de patches gerandomiseerd aan te brengen op de laesies.**

We overwogen drie methodes voor het aanbrengen van de laesies:

- handboor met schuurkop: beschreven in literatuur, maar bij voorbereidende proeven op varkenslevers is gebleken dat er hierbij veel druk gezet moet worden, waardoor er in plaats van een schaaf-/snijlaesie soms eerder een scheurlaesie ontstaat.
- biopsiepunch van 10mm met uitsnijden/knippen op 2-3mm diepte: snel en effectief, maar niet beschreven in literatuur.

- uitsnijden van kapsel met behulp van mes en mal. Deze methode wordt gebruikt door [REDACTED]. De techniek lijkt geschikt maar is nog niet beschreven in de literatuur.

In de pilot zullen we bovenstaande methodes zelf proberen, waarna we de meest geschikte zullen gaan gebruiken.

De bloeding die vervolgens ontstaat zal kort met gazen worden getamponneerd en daarna zal er gerandomiseerd één van de verschillende patches (à 3x3cm) worden aangebracht. Vervolgens zullen de primaire uitkomsten van dit experiment worden bepaald:

- tijd tot hemostase (beoordeeld door 2 observeerders)
- bloedverlies per laesie (wegen van gazen die worden gebruikt voor afdeppen van overtollig bloed). Daarna zullen de laesies worden geobserveerd tot 5 minuten nadat hemostase is bereikt. Hierna zal de buik worden gesloten.

Laparoscopie

Tussen de eerste operatie en het opofferen zal er een tussentijdse laparoscopie onder algehele narcose (protocol zie H3) worden verricht (zie Tabel 1). De doelen hiervan zijn:

- Controleren van de laesies op nabloedingen
- Inspecteren van de toestand van de patches en aanwezigheid van verklevingen
- Verkrijgen van samples (patch+onderliggend orgaanweefsel) voor histologisch onderzoek (van elk type patch zal er één patch worden verwijderd)
- Bepalen van laparoscopische toepasbaarheid van [REDACTED]. Hiervoor zal gebruik worden gemaakt van de bloeding die is ontstaan bij het verkrijgen van de samples voor histologisch onderzoek. (Mocht dit lastig blijken met [REDACTED] dan zullen we conventionele methodes gebruiken (gazen, electrocoagulatie, [REDACTED]) om hemostase te bereiken. Omdat het nog steeds om bloedingslaesie met bescheiden afmetingen gaat, verwachten we geen problemen hierbij.)

Opofferen

Op verschillende momenten (zie tabel 1) zullen de dieren worden opgeofferd. Hierbij zal er eerst onder algehele narcose (zie protocol onder H3) een laparotomie worden verricht waarbij alle laesies en patches zullen worden geïnspecteerd op afbraakstadium, ontstekingsreacties, abcesvorming, orgaanschade/fibrosering en verklevingen. Omdat de afbraaksnelheid van kale collageensponzen rond de 2 maanden ligt, en we een vergelijkbare afbraaksnelheid verwachten, zullen we een follow-up tot en met 3 maanden gebruiken. Aan het eind van de laparotomie zullen er enkele aanvullende 'hoog risico' bloedingen worden gemaakt omdat we het gebruik van [REDACTED] hiervoor willen testen. Dit betreft o.a. bloedingen van grote vaten (liesslagaders, aorta), maar ook zullen grotere letsels worden gemaakt van de milt, de nieren en de sacrale veneuze plexus, ter voorbereiding op dierproef 3.4.4.4. Aan het eind van de procedure zullen de dieren gedood worden met een overdosis pentobarbital.

Algemeen

Bij elke procedure (laparotomie, laparoscopie en opofferen) zal er ook bloed worden afgenomen voor analyse van de stollingsstatus, bloedwaarde en ontstekingswaarden.

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

Door zowel de lever als milt te gebruiken en op elk orgaan meerdere laesies te maken, worden zoveel mogelijk samples per dier getest. Door gebruik te maken van tussentijdse inspectie met behulp van laparoscopie hoeven er minder grote groepen gebruikt te worden voor het verkrijgen van informatie op de verschillende tijdstippen. Omdat we bij de laparoscopiën ook meteen de laparoscopische toepassing van [REDACTED] testen, hoeven ook

hier geen extra dieren voor te worden gebruikt. Tenslotte zullen vlak voor opoffering de hoogrisico bloedingen worden getest, zodat elk dier optimaal wordt gebruikt en hier ook geen extra dieren voor nodig zijn.

De voorlopige berekening voor het benodigde aantal testen per sample is verwerkt in onderdeel B1.

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 varkens

Geslacht: Vrouwelijk, omdat hier de meeste ervaring mee is binnen ██████ en deze makkelijker te handelen zijn. We verwachten niet dat geslacht een significante invloed heeft, maar willen de groepen liefst zoveel mogelijk gelijk houden.

Leeftijd: volwassen, ouder dan 10 weken.

Gewicht: tussen 30 en 80kg. **Eerdere hemostase experimenten zijn uitgevoerd met varkens vanaf 30kg (Lewis, ISRN Surgery 2014). Het bijgewoonde experiment in ██████ werd uitgevoerd met een varken van 40kg. De levergrootte was daarbij geschikt voor het uitvoeren van de experimenten. In ██████ wordt vooral gewerkt met varkens tussen 40 en 80kg. We kiezen ervoor om geen gebruik te maken van varkens die uitgegroeid zijn, omdat deze met een gewicht tussen de 120 en 200kg zeer moeilijk te hanteren zijn. Voor zover bekend verandert de bloedstolling nauwelijks vanaf de geboorte en is er dus geen reden om oudere dieren te gebruiken.**

Geschatte aantallen

a. Pilot

Aantal dieren: 2

Toelichting: omdat we ook met *ex vivo* proeven hebben geoefend, en we meerdere laesies per dier maken, verwachten we niet meer dan 1 dier nodig te hebben om het model te testen. Echter, omdat we het model eventueel in een gehepariniseerd varken willen testen, zullen we mogelijk twee dieren gebruiken.

b. Veiligheid en Effectiviteit

Aantal dieren: 20

De benodigde groepsgrootte voor het vergelijken van de hemostase resultaten zal deels afhangen van het pilot deel en van dierproef 3.4.4.1.

De groepen zijn:

Groep 1: ██████ (huidige 'gouden standaard')

Groep 2: ██████ (experimentele groep)

Groep 3: ██████ (extra vergelijking)

Groep 4: kale collageenspons (negatieve controle)

Groep 5: ██████████, eventueel 2e prototype

De benodigde sample size zal worden berekend om te bepalen of het ██████████-eindproduct (groep 2) zorgt voor een significant snellere hemostase ten opzichte van de huidige standaard (groep 1). Omdat daarnaast ook zal worden vergeleken met groep 3, wordt er een Bonferroni correctie toegepast voor 3 vergelijkingen. Omdat groep 4 enkel wordt gebruikt als negatieve controle, zal hiervoor niet worden gecorrigeerd. Ook als er een tweede prototype van ██████████ wordt gebruikt zal er niet verder worden gecorrigeerd voor de mogelijke extra vergelijkingen, omdat de vergelijking met de gouden standaard de belangrijkste blijft. Bij het totaal benodigde aantal dieren is al wel rekening gehouden met groep 5.

De 5 materialen worden gerandomiseerd per laesie. Er wordt gebruik gemaakt van blokrandomisatie, dus per dier wordt elk materiaal twee keer gebruikt

Lever- en miltletsels lijken erg op elkaar, maar zijn niet direct te vergelijken. Daarom is de sample size voor beide groepen apart berekend.

Met behulp van de sample size calculator op <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html> zal voor het experiment een powerberekening worden gemaakt.

Geschatte sample size per groep: 38 laesies
Totaal aantal voor 5 groepen: 190 leverlaesies en 190 miltlaesies

Uitgaande van gemiddeld 10 leverlaesies en 10 miltlaesies per dier zijn er hiervoor 19 varkens nodig. Rekening houdend met uitval schatten we het benodigde aantal dieren initieel op 20.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Varken, Z of Z/N-lijn varkens	Registerd EU breeder	22	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.

Vervanging

In de ontwikkelingsfase van [REDACTED] is gebruikt gemaakt van *ex vivo* experimenten om de effectiviteit van verschillende prototypen te onderzoeken. Hierdoor kon het gebruik van dierproeven voor het betreffende onderzoek vermeden worden. Ook is het 'leverschade-model' getest op varkenslevers, om de kans op onvoorziene omstandigheden te verminderen.

Bij een orgaanbloeding en het aanbrengen van lichaamsvreemd materiaal spelen vele factoren (bloeddruk, stollingscascade, immunoreacties) een rol. Het is nog onmogelijk om deze complexe processen samen te simuleren in een *in vitro* model.

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. Daarnaast beperken we de aantallen door elk dier optimaal te gebruiken (meerdere samples per dier, tussentijdse laparoscopie, hoogrisico testen bij opoffering).

Verfijning

De operaties worden uitgevoerd met aseptische technieken om de kans op exogene infectieuze complicaties te verminderen en worden gedaan door ervaren (laparoscopische) chirurgen. Door het toepassen van tussentijdse laparoscopie, in plaats van laparotomie, beperken we het ongerief van de tussentijdse operatie. Ook 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). 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.

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

Verwerkt in D3.1

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.

NVT

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 in samenspraak met de dierenarts en de geldende protocollen binnen het CDL toegepast.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Voorafgaand aan de operatie zullen de dieren geringe stress ondervinden van de inleiding van de operaties. De varkens zullen eerst licht gesedeerd worden om deze stress te beperken. Na de buikoperaties is er sprake van een herstelperiode van ongeveer 2-3 dagen. In deze periode kunnen de dieren last hebben van buikpijn, verminderde eetlust en vermoeidheid. Na de laparoscopische operaties zal dit minder zijn dan bij de open buikoperaties. Om de pijn te beperken wordt er in de postoperatieve fase pijnstilling gegeven.

Omdat er tijdens de operatie orgaanletsels worden aangebracht, bestaat er een theoretische kans op een nabloedingen. We schatten deze kans in als zeer laag (<5%), omdat de operatie pas wordt beëindigd als er adequate stolling is opgetreden. Mocht er toch een nabloeding ontstaan, dan zou dit kunnen resulteren in buikpijn en darmobstructie (door stoppen van peristaltiek), en bij ernstig bloedverlies kan het dier in shock raken of overlijden.

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.

Bij varkens wordt gelet op lichaamsgewichts, koorts, apathisch gedrag, slechte voeropname. In geval van verslechterde conditie, zoals niet meer overeind kunnen komen of niet meer zelfstandig kunnen eten of drinken, wordt contact opgenomen met de dierenarts om te overleggen over verder beleid (behandeling of uit experiment halen).

Indicate the likely incidence.

Wij schatten in dat de kans op het behalen van het humane eindpunt minder dan 5% is.

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).

Het cumulatieve ongerief wordt ingeschat als matig, en wordt met name gevormd door het herstel van de buikoperatie.

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.

Voor alle experimenten in dit project is het nodig om aan het eind van de proef de buikholte te inspecteren op de toestand van [REDACTED] en de buikorganen. Hiervoor moeten de dieren opnieuw geopereerd worden. Daarnaast hebben we zowel het bloed als het lever/huidweefsel van de varkens 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.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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>3</td><td>3.4.4.3 Afbraak en langetermijneffecten rat</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	3	3.4.4.3 Afbraak en langetermijneffecten rat
Serial number	Type of animal procedure					
3	3.4.4.3 Afbraak en langetermijneffecten 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:

- bepalen afbraaksnelheid
- bepalen afbraakreacties en langetermijneffecten

Experimentele opzet

Groepen 1a/b/c/d: aanbrengen █████ op lever, in buikholte en subcutaan;
opoffering respectievelijk na 2/4/8/12 weken

De belangrijkste uitkomsten waar we in dit onderdeel naar zullen kijken zijn: de afbraaksnelheid van █████ (macroscopische evaluatie/histologie/bloedtesten), het optreden van ontstekingsreacties (histologie/bloedwaarden), erodering van weefsel (macroscopisch en microscopisch), en het ontstaan van verklevingen aan █████. Daarnaast wordt gekeken naar aanwezigheid van productbestanddelen in o.a. orgaanweefsel (lever/nier) en plasma (allen te verkrijgen bij opoffering).

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

Experimentele handelingen

Conform dierproef 3.4.4.1 zullen er bij elke rat onder gasanesthesie (isofluraan) twee leverlaesies worden gemaakt waarop █████ wordt aangebracht. Daarnaast zullen er nog twee stukken caudaal in de buikholte worden achtergelaten en zal er ook links en rechts op de rug subcutaan een stuk █████ worden geplaatst. Het gebruik van meerdere stukken █████ levert meer informatie op per dier. Omdat er een kans bestaat dat de █████ in de toekomst ook op andere buikorganen en de huid gebruikt zou kunnen worden, is het relevant om dit ook te bestuderen. Na hechten van de buik en huidwonden, zullen de dieren na 2, 4, 8 en 12 weken worden opgeofferd. Hiertoe zullen de dieren een relaparotomie ondergaan, gevolgd door een inspectie van de buikholte en subcutane locaties waar █████ is achtergelaten. Hierna zullen de dieren worden gedood door verbloeding en cervicale dislocatie. Voor het kiezen van de juiste opoffermomenten is er gekeken naar de afbraaksnelheid van kale collageensponsen (gemiddeld 8 weken), zodat in dit experiment niet onnodig veel groepen hoeven te worden gebruikt.

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

Per experiment zal er een weloverwogen berekening of beredening worden gedaan voor het bepalen van de groepsgrootte. Daarbij maken we gebruik van de *sample size calculator* op <http://www.select-statistics.co.uk/sample-size-calculator-two-proportions>.

Geschatte aantallen

Aantal groepen: 4

Gemiddelde n per groep: 10

Subtotaal aantal dieren: 40

Toelichting: er worden vier opoffermomenten en daarom vier groepen gebruikt. Het aantal benodigde groepen en dieren in dit onderdeel zal gedeeltelijk afhangen van de uitkomsten van onderdeel 3.4.4.1 en 3.4.4.2. In die onderdelen zullen we 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. We verwachten dat de afbraaksnelheid deels af zal hangen van het bloedverlies, maar dat de spreiding niet groot zal zijn. Derhalve verwachten we dat een groepsgrootte van 10 dieren voldoende proportionele waarde zal geven om het afbraakpercentage op de verschillende tijdstippen te bepalen.

B. The animals

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

Soort: Rat

Ras: Wu (Wistar)

Geslacht: beide

Leeftijd: adult

Herkomst: registered EU breeder

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat, Wistar	Registered EU breeder	40	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.

Vervanging& vermindering

Voor het kiezen van de juiste opoffermomenten is er gekeken naar de afbraaksnelheid van kale collageensponsen (gemiddeld 8 weken), zodat in dit experiment niet onnodig veel groepen hoeven te worden gebruikt. Er is nagedacht om de spons radioactief te labelen om de afbraaksnelheid te meten. Echter we voorzien dat deze ingewikkelde labeling techniekpas over een aantal jaren beschikbaar is en op zich geen vermindering van dieren zal geven .

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.

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 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.

NVT

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 gebruikt 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 en wordt de voeding verweekt om het eten en drinken te vergemakkelijken. **Na twee tot drie dagen zal de klinische conditie van de ratten genormaliseerd zijn, dat zich uit in een herstellend gewicht en activiteiten patroon.**

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.

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, veroorzaakt door eventuele ontstekingsreacties of darmobstructie, af te meten aan uiterlijke kenmerken zoals sterk verminderde activiteit, bolle rug, opstaande haren en brilogen, ingevallen of juist bolle buik. 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 deze lange termijn experimenten 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).

We schatten het ongerief in als Matig, met name door het herstel van de buikoperatie en de beperkte kans op complicaties.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No

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 [REDACTED] en de buikorganen. Hiervoor moeten de dieren opnieuw geopereerd worden. Daarnaast hebben we zowel het bloed als het lever/huidweefsel 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.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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 4	Type of animal procedure 3.4.4.4 Veiligheid bij contaminatie 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:

- bepalen of gebruik van [REDACTED] veilig is in een gecontamineerde buikholte

Experimentele opzet

Groep 1: contaminatie buikholte (controle)

Groep 2: contaminatie buikholte met dezelfde hoeveelheid [REDACTED] als getest in 3.4.4.1

Groep 3: contaminatie buikholte met een dubbele hoeveelheid [REDACTED]

Belangrijkste uitkomsten is het verloop van infecties bij aanwezigheid van [REDACTED] (mortaliteit, hoeveelheid en grootte van abscessen/peritonitis). Secundair wordt gekeken naar ontstekingsparameters in plasma. Dit zijn ook in de kliniek de belangrijkste parameters aangezien deze gebruikt worden om de ernst van de infectie en het risico voor de patiënt weer te geven.

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

Experimentele handelingen Voor het bestuderen van de invloed van contaminatie zullen we gebruik maken van een model waarbij er bacteriën in de buikholte worden ingebracht. Het model betreft het 'Inoculatiemodel' waarbij een combinatie van fecale vezels en een bekende hoeveelheid van twee soorten bacteriën (*E.coli* en *B.fragilis*) in de buikholte wordt gespoot. Wij gebruiken dit model omdat dit goed te standaardiseren is en wij een ruime en recente ervaring mee hebben. [REDACTED]

[REDACTED]. Door dit algemeen geaccepteerde model (Erginel et al. TJTES 2014; Rosman et al. Eur.J.Surg 1999) te gebruiken hoeven geen extra dieren gebruikt te worden om de onderzoekers te trainen en een nieuw model op te zetten.

Bij dit model wordt er een uur na de initiële contaminatie een laparotomie gedaan onder algehele narcose (isofluraan, zie onder H voor details), waarbij de buik wordt gespoeld en het buikschort chirurgisch wordt verwijderd, om de gevolgen van de infectie te beperken. Afhankelijk van de groep, zal er bij deze laparotomie ook [REDACTED] in verschillende hoeveelheden worden ingebracht in de buikholte. Voor de duidelijkheid, hierbij wordt er dus geen lever- of miltletsel aangebracht. De dieren zullen worden opgeofferd op dag 5. 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 te beperken. Het opofferen zal gebeuren door de dieren opnieuw onder narcose (isofluraan zie H) te brengen, de huid- en buikwand te openen en de buik te inspecteren en scoren op abscessen en adhesies.

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 het project verdeeld in verschillende stadia. Pas als uit de eerdere dierproeven blijkt dat █████ effectief en veilig is, zal er de contaminatie experimenten begonnen worden. Daarnaast zal er een weloverwogen berekening worden gedaan voor het bepalen van de groeps grootte. Omdat we met name proportionele uitkomstmaten gebruiken (mortaliteit, aantal abscessen), maken we gebruik van de *sample size calculator* op <http://www.select-statistics.co.uk/sample-size-calculator-two-proportions> om een powerberekening te maken.

B. The animals

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

Soort: Rat
Ras: Wu (Wistar)
Geslacht: Beide
Leeftijd: adult
Herkomst: registered EU Breeder

Geschatte aantallen

Aantal groepen: 3
Gemiddelde n per groep: 15
Subtotaal: 45

Toelichting: Bij eerdere experimenten naar veiligheid bij contaminatie was de benodigde groeps grootte gemiddeld 15 ratten per groep. Dit betrof o.a. onderzoek naar anti-adhesie gels, en leverde adequate statistische bewijskracht. Daarom hebben we dit aantal ook gebruikt als schatting voor het benodigde aantal dieren voor het betreffende onderdeel.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat, Wistar	Registered EU breeder	45	Adult

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.

Vervanging& vermindering

Er is gezocht naar de mogelijkheid om zonder dierproeven de veiligheid bij contaminatie in de buikholte te bestuderen, maar hier werden geen adequate modellen voor gevonden. De ontstekings en genezingsprocessen die hierbij gepaard gaan zijn dermate complex dat er (nog) geen geschikte *in vitro* modellen hiervoor zijn. Dit experiment gaan we uiteraard pas uitvoeren indien de voorafgaande experimenten met succes zijn afgerond.

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 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.

NVT

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 gebruikt 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 en wordt de voeding verweekt om het eten en drinken te vergemakkelijken. **Na twee tot drie dagen zal de klinische conditie van de ratten genormaliseerd zijn, dat zich uit in een herstellend gewicht en activiteiten patroon.**

Door contaminatie van de buikholtte is er een grotere kans op infectieuze complicaties. Bij vrijwel alle dieren treden er kleine abcessen op. Uit ervaring weten we dat de ratten hier buikklachten aan ondervinden. Bij een deel van de dieren (10-30%) treedt er gegeneraliseerde peritonitis op, waarbij ernstige buikpijn, 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, bolle rug, opstaande haren en brilogen, ingevallen of juist bolle buik. 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.

Tijdens peritonitis experimenten die onze groep de laatste jaren heeft uitgevoerd, is gebleken dat een goede score voor het humane eindpunt erg lastig is op te stellen. Daarom is besloten dat onderzoekers samen met ervaren biotechnici de dieren beoordeelden. Dit heeft tijdens de laatste paar experimenten met dit model gezorgd voor een minimale onvoorziene sterfte. We zullen dit proces ook voor dit experiment volgen. Daarnaast zullen we ook de pain face index bijhouden. **Dit implementeren we omdat we willen weten of deze methode ons in de toekomst een betere maat kan geven voor het ongerief.**

Indicate the likely incidence.

Uit eerdere projecten blijkt dat de kans op het bereiken 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).

We het ongerief bij het grootste aantal dieren (70-90%) in als matig, en bij 10-30% als ernstig, als gevolg van buikvliesontsteking. 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

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

Voor dit experiment is het nodig om aan het eind de buikholte te inspecteren op de aanwezigheid en grootte van abscessen en adhesies, de toestand van [REDACTED] en de toestand van de organen. Hiervoor zullen de dieren opnieuw onder narcose worden gebracht (zie H). Daarnaast hebben we zowel bloed als organen nodig van deze ratten voor aanvullende analyses. Daarom zullen de dieren aan het eind van het experiment worden geofferd.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 5	Type of animal procedure 3.4.4.5 Ernstige bloedingen 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.

Het doel van dit onderdeel is het bepalen van de effectiviteit van ██████ bij de behandeling van hoog risicobloedingen, waaronder leverresecties met grotere oppervlakten, miltletsels, nierresecties, sacrale veneuze plexus letsels en slagaderlijke bloedingen.

Omdat orgaangrootte en bloedingsoppervlak hierbij een belangrijke rol speelt gebruiken we in dit onderdeel varkens. Ook hierbij kijken we primair naar het bereiken van hemostase en secundair naar tijd tot hemostase en hoeveelheid bloedverlies.

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

Onder algehele narcose (voor protocol zie H3) zal er een laparotomie worden verricht. Vervolgens zal er één voor één een orgaanbloeding worden gemaakt welke behandeld wordt met ██████. Hierbij is de primaire uitkomst het bereiken van hemostase. Secundair wordt gekeken naar de tijd tot hemostase en de hoeveelheid bloedverlies.

De orgaanletsels zullen worden gemaakt in een volgorde op basis van het verwachte bloedverlies, beginnend bij 'weinig' en eindigend met veel. Ook wordt gekeken naar de benaderbaarheid van het orgaan. Dit leidt tot de geplande volgorde van:

1. Lever: partiële resectie mediale leverkwab, zoals in klinische situatie
2. Milt: kapsel + parenchymletsel met mes (Freire, Taha et al. 2011)
3. Nier: onderpoolresectie
4. Veneuze plexus: nader te bepalen in 3.4.4.2
5. Grote arteriën: nader te bepalen 3.4.4.2 (naaldpunctie of longitudinale snede)

Aan de hand van de conditie van het dier (bloeddruk) tijdens de operaties, zal besloten worden welke letsels allemaal zullen worden gedaan.

Omdat de primaire uitkomst van dit onderdeel het bereiken van hemostase tijdens de operatie is, en het totale bloedverlies naar verwachting groot is, zullen de dieren aan het eind van de operatie worden gedood.

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

Door zoveel mogelijk bloedingslaesies per dier te onderzoeken, proberen we het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. Omdat dit onderdeel een 'haalbaarheidsstudie' betreft, en er geen groepen worden vergeleken, zal er geen sample size berekening worden gedaan voor vergelijkende statistiek. Het aantal dieren zal vooral worden gebaseerd op de bevindingen van onderdeel 3.4.4.2 en de daaruit voortvloeiende verwachting over de effectiviteit van ██████ bij grote bloedingen.

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 varkens

Geslacht: Vrouwelijk, omdat hier de meeste ervaring mee is binnen █████ en deze makkelijker te handelen zijn. We verwachten niet dat geslacht een significante invloed heeft, maar willen de groepen liefst zoveel mogelijk gelijk houden.

Leeftijd: volwassen, ouder dan 10 weken

Gewicht: tussen 30 en 80kg. Eerdere hemostase experimenten zijn uitgevoerd met varkens vanaf 30kg (Lewis, ISRN Surgery 2014). Het bijgewoonde experiment in █████ werd uitgevoerd met een varken van 40kg. De levergrootte was daarbij geschikt voor het uitvoeren van de experimenten. In █████ wordt vooral gewerkt met varkens tussen 40 en 80kg. We kiezen ervoor om geen gebruik te maken van varkens die uitgegroeid zijn, omdat deze met een gewicht tussen de 120 en 200kg zeer moeilijk te hanteren zijn. Voor zover bekend verandert de bloedstolling nauwelijks vanaf de geboorte en is er dus geen reden om oudere dieren te gebruiken.

Geschatte aantal: 10 varkens

We schatten drie tot vijf operaties nodig te hebben om in te schatten of gebruik van █████ voor de verschillende toepassingen haalbaar is. Mochten we erachter komen dat dit niet het geval is, zetten we het experiment niet voort. Als dat wel het geval is schatten we in 10 operaties nodig te hebben om te bewijzen dat het gebruik van █████ ook daadwerkelijk geschikt en veilig is.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Varken, Z- of Z/N-lijn	registered EU breeder	10	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.

Vervanging

In de ontwikkelingsfase van ██████ is gebruikt gemaakt van ex vivo experimenten om de effectiviteit van verschillende prototypen te onderzoeken. Hierdoor kon het gebruik van dierproeven voor het betreffende onderzoek vermeden worden. Bij een orgaanbloeding en het aanbrengen van lichaamsvreemd materiaal spelen vele factoren (bloeddruk, stollingscascade, immuunreacties) een rol. Het is nog onmogelijk om deze complexe processen samen te simuleren in een in vitro model.

Vermindering

Door bij het opofferen in onderdeel 3.4.4.2 al de methodes voor dit onderdeel te oefenen hoeven hier geen extra dieren voor gebruikt te worden. Doordat we in 3.4.4.2 ook al beginnen met het testen van ██████ kan mogelijk het aantal dieren voor dit onderdeel verminderd worden. Door zoveel mogelijk bloedingslaesies per dier te onderzoeken, proberen we het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden.

Verfijning

Door de dieren aan het eind van de operatie onder narcose te doden, besparen we de dieren het ongerief van het herstel van de operatie. 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.

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.

NVT

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 in samenspraak met de dierenarts en de geldende protocollen binnen ████████ toegepast.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Voorafgaand aan de operatie zullen de dieren geringe stress ondervinden van de inleiding van de operaties, omdat ze uit hun leefomgeving worden gehaald en inleidingsmedicatie krijgen toegediend. De varkens zullen eerst licht gesedeerd worden om deze stress te beperken (zie protocol onder H3).

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.

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).

Dit is een terminaal 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.

Dit is een terminaal experiment. Gezien de grote hoeveelheid bloedverlies, worden de dieren gedood en is geen andere optie mogelijk.

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 2015-0012
2. Titel van het project: Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties
3. Titel van de NTS: Het gebruik van GAT-Patch om te zorgen voor snellere bloedstolling bij operaties.
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: 21-07-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 04-08-2015 en 14-10-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 13-08-2015 tot 22-09-2015 en van 14-10-2015 tot 24-11-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-09-2015 en 24-11-2015
 - advies aan CCD: 14-12-2015
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: 13-08-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Niet-technische samenvatting:**
 - 3.5 Het is niet de bedoeling dat hier het gemiddelde ongerief voor alle dieren wordt vermeld. De onderzoekers worden verzocht deze vraag te beantwoorden conform de richtlijnen van de CCD.
 - 4.3 De tweede zin is onvolledig.

Project Proposal:

-3.1 Uit de dierproeven blijkt dat er in sommige proeven ook infecties worden aangebracht, maar de rationale hiervoor wordt niet genoemd in de achtergrond.

-3.1 Hoe vaak komt verhoogd bloedverlies met de beschreven complicaties voor bij bv leverresectie en multitrauma bij gebruik van het product dat nu als gouden standaard fungeert in de kliniek? Bij onderdeel 3.3 wordt het verbeteren van de klinische uitkomst genoemd, terwijl dat hier onvoldoende is beschreven.

-3.1 Kunnen de onderzoekers, meer specifiek dan in de huidige eerste alinea, de omvang van het klinisch probleem beschrijven? Om wat voor soort operaties gaat het hier en hoe frequent zijn complicaties veroorzaakt door bloedverlies en nabloedingen? De onderzoekers worden verzocht referenties toe te voegen welke de problematiek duidelijk beschrijven.

-3.1 De onderzoekers zoeken een alternatief voor de huidige kostbare patches met materiaal van dierlijke en menselijke afkomst. Verwachten de onderzoekers de incidentie van ernstige complicaties vanwege verhoogd bloedverlies te kunnen verlagen door een betere hemostase met de nieuwe patches, of gaat het uitsluitend om het ontwikkelen van een goedkoper alternatief zonder dierlijke en menselijke materialen? In de huidige beschrijving van de achtergrond van deze aanvraag is onvoldoende toegelicht welke nadelen kleven aan het gebruik van een product met dierlijke en menselijke materialen.

-3.2 De onderzoekers worden verzocht hier alleen de eerste 3 zinnen en de alinea over de haalbaarheid te laten staan, en de rest van de tekst naar het onderdeel basic outline van de strategie (3.4.2) te verplaatsen en de hierin gegeven informatie over de achtergrond van het project te verplaatsen naar onderdeel 3.1. Onder 1.a staat een opmerking over het ontbreken van ervaring bij 'andere universitaire centra'. Waarom is dit relevant? Onder 1.b is de uitleg waarom de onderzoekers 6-12 prototypes willen testen niet voldoende (op welke manier verschillen de prototypes van elkaar waardoor deze allemaal in vivo getest moeten worden?), en blijven de criteria voor selectie van het meest geschikte prototype onvermeld.

-3.2 Bij de haalbaarheid wordt vermeld dat ██████████ vergelijkbare experimenten zullen worden uitgevoerd. Waarin verschillen de experimenten die ██████████ zullen plaatsvinden van de voorgestelde experimenten, en hoe wordt ervoor gezorgd dat er geen onnodige herhaling van onderzoek plaatsvindt?

-3.2 Wat kunnen de onderzoekers melden over de haalbaarheid van de experimenten met ratten?

-3.4.3 Bij de beschrijving van de verschillende dierproeven vermelden de onderzoekers nog meer selectiepunten en go/no go momenten. Zij worden verzocht deze (ook) hier te benoemen.

Description of Animal Procedures:

-DAP1, onderdeel A1.

*Vanwege het verschil in afmeting van de lever kiezen de onderzoekers voor een rattenmodel in plaats van een muizenmodel. Kunnen de onderzoekers duidelijker opschrijven waarom de lever van een muis te klein is voor deze experimenten, of alleen uitleggen waarom de rat volgens de onderzoekers het meest geschikte model is?

*Waarom doen de onderzoekers zowel een biopsie als een naaldpunctie, terwijl zij al verwachten dat een naaldpunctie mogelijk te gering bloedverlies veroorzaakt?

*Welke hoeveelheid bloedverlies bedoelen de onderzoekers met teveel bloedverlies (laatste alinea onder 'a. Pilot hemostasemodel')?

*Onder 'b. prototypeselectie' ontbreekt een uitleg van de verschillen tussen de te testen prototypes waaruit blijkt dat zij alle 12 in vivo getest moeten worden. De huidige omschrijving is daarvoor onvoldoende (zie ook eerste vraag over onderdeel 3.2 van het project proposal). Het is onduidelijk naar welke subgroep de onderzoekers verwijzen in deze alinea. Wat is de functie van groep 1 in het prototype selectie experiment? De resultaten uit groepen 3-15 kunnen vergeleken worden met het referentieproduct (groep 2).

-DAP1, onderdeel A2

*Het meten van de lichaamstemperatuur (ten behoeve van het bepalen van humane eindpunten) ontbreekt.

-DAP1, onderdeel A3.

*Graag duidelijk opschrijven wat wordt bedoeld met subgroep (zie ook het laatste punt bij onderdeel A1).

*Is er bij het berekenen van de benodigde groepsgrootte voor onderdeel B rekening gehouden met het grote aantal benodigde vergelijkingen (zoals bij DAP-2 verwezen wordt naar een Bonferroni correctie)? De gebruikte aantallen zijn waarschijnlijk ontoereikend.

-DAP1, onderdeel B

*Het gegeven argument voor het gebruik van uitsluitend mannelijke dieren is niet valide. Het uiteindelijke product zal ook in vrouwen gebruikt worden. Indien de onderzoekers bijvoorbeeld menen dat het aantal benodigde dieren door het gebruik van beide sexen toeneemt of dat er geen verschillen tussen mannen en vrouwen te verwachten zijn, dan dienen zij dit te beargumenteren.

*De commissie raadt het hergebruik van dieren afkomstig uit andere experimenten voor de pilot af, juist omdat de uitkomst van deze pilot de opzet van de andere experimenten bepaalt.

-DAP1, onderdeel D: De onderzoekers kunnen hier tevens vermelden dat het aantal proefdieren wordt beperkt door meerdere laesies per dier aan te brengen.

-DAP1, onderdeel H. De commissie adviseert hier alleen de middelen te noemen zonder concentraties en tijdsunten.

-DAP1, onderdeel I. De herstelperiode na een buikoperatie is langer dan 2 dagen. De onderzoekers kijken immers ook op dag 3 en dag 7 naar herstel van het weefsel.

-DAP2, onderdeel A1

*In AP1 worden leverbloedingen als belangrijkste toepassing genoemd, hetgeen reden is om laesies in de lever te onderzoeken. Dit komt niet overeen met de tekst in deze dierproef, waarin zowel lever- als miltlaesies worden onderzocht omdat ze klinisch relevant zijn. Kunnen de onderzoekers uitleggen waarom laesies in de milt bij varkens wel klinisch relevant zijn maar bij ratten niet?

*De reden om deze proeven met een groot proefdier te doen is de klinisch relevante grootte van de orgaanlaesies. De aangebrachte laesies zijn echter klein (diameter van 1 cm). Kunnen de onderzoekers aangeven waarom zij dit toch klinisch relevant vinden?

*De 10 laesies worden elk als onafhankelijke laesie beschouwd. Is de 10e laesie werkelijk qua bloedingseigenschappen nog vergelijkbaar met de eerste laesie c.q. zijn de omstandigheden

waaronder deze laesies worden aangebracht (bijvoorbeeld ten gevolge van het ontstane bloedverlies uit de laesies 2 t/m 9) nog vergelijkbaar?

*Worden de 5 materialen gerandomiseerd toegepast op alle laesies, of wordt er per varken gerandomiseerd? Of wordt er slechts 1 materiaal per varken gebruikt? Hoe denken de onderzoekers er voor te kunnen zorgen dat vergelijkbare aantallen dieren (èn ook vergelijkbare aantallen laesies die met hetzelfde materiaal behandeld zijn) op de verschillende tijden worden gedood?

*Waarom vragen de onderzoekers dieren tussen de 30-80 kilo die 10 weken oud zijn, in plaats van volwassen dieren?

-DAP3-5

*De commissie heeft de eerste twee bijlagen besproken. Vanwege de vele gerezen vragen en omwille van de noodzaak ook andere agendapunten te behandelen, heeft zij besloten om u te verzoeken om deze te beantwoorden en daarnaast zelfstandig de overige bijlagen aan te passen in lijn met de opmerkingen en vragen over de eerste twee bijlagen. Bij de volgende bespreking van uw aangepaste projectaanvraag zal de commissie ook de andere bijlagen behandelen en eventueel nog vragen hierover stellen.

- Datum antwoord: 22-09-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-3.5 Het antwoord bij vraag 3.5 is veranderd conform de richtlijnen van de CCD: Het ongerief bij de experimenten met de ratten kan als volgt ingedeeld worden: 11.5% terminaal, 85% matig en 3,5% ernstig. Bij de varkens is het ongerief ingeschat op 31% terminaal en 69% matig.

-4.3 De zin is aangepast: Op basis van literatuur en eigen ervaring zijn de rat en het varken het meest geschikt voor het huidige project. Om de uitkomsten van het onderzoek van bloedstollende sponzen te vertalen naar de mens is overeenkomst in de grootte van de organen belangrijk. Daarom worden varkens gebruikt.

Project Proposal:

-3.1 De rationale hierachter stond reeds vermeld, maar bij het betreffende onderdeel onder 3.2. Onder 3.1 stond enkel een algemene verwijzing. We hebben nu ook onder 3.1 het contaminatieonderdeel als volgt benoemd:

"In het huidige projectvoorstel gaan we verder met de volgende stap, waarin wordt onderzocht welke van de prototypes van ████████ het beste functioneert als er een actieve bloeding is in de buikholte. Hierbij spelen factoren mee zoals bloeddruk, stolling, temperatuur, ademhalingsbewegingen, peristaltiek van darmen in de buurt en inflammatoire reacties door de aangebrachte schade. Hiervoor is het nodig om gebruik te maken van levende proefdieren. Daarnaast willen we onderzoeken hoe effectief ████████ is in vergelijking met bestaande producten, hoe lang het in het lichaam aanwezig blijft en of het product ongewenste bijwerkingen heeft. Ook willen we bestuderen of het gebruik van ████████ veilig is in een geïnfecteerde omgeving, omdat er bij buikoperaties sprake kan zijn van bacteriële contaminatie en infecties hardnekkiger kunnen verlopen als er vreemd lichaam ████████

materiaal aanwezig is. We hebben het project opgedeeld in verschillende onderdelen welke hieronder staan vermeld en die verder worden beschreven onder 3.4 Onderzoeksstrategie.

- 3.1 De volgende tekst is toegevoegd aan de achtergrond informatie:

"...met grote terughoudendheid gebruikt. Desondanks wordt er wereldwijd jaarlijks voor bijna 150 miljoen dollar aan ████████ verbruikt, wat neerkomt op zo'n 400.000 tot 1.000.000 stuks. Dit is een indicatie van de frequentie waarin 1 soort patch wordt gebruikt. ████████ wordt in de buikchirurgie vooral gebruikt bij leverresecties.

In totaal worden er wereldwijd per jaar ruim 250 miljoen chirurgische ingrepen gedaan, waarbij ernstige bloedingen kunnen optreden (Weiser et al, Lancet 2008). Ze worden onder andere vaker gezien bij operaties aan de lever en bij traumatische of chirurgische letsels van de milt. Het aantal leverresecties is moeilijk te bepalen, maar gezien de wereldwijde incidentie van primaire leverkanker (rond 1 miljoen) en leveruitzaaiingen van borst-, long- of darmkanker (>1 miljoen), wordt het aantal hoog ingeschat (cancer.org). Bij leverresecties varieert het bloedverlies van 500-2500ml, en heeft zo'n 25% van de patiënten bloedtransfusie nodig. Verder is fors bloedverlies vaak een reden om een kijkoperatie te converteren naar een open buik operatie, en is het in sommige studies geassocieerd met een mortaliteit van 23-46% (Romano et al., HPB Surgery 2012; Hilal et al. J Gastroint Surg 2011; Belghiti et al., JACS 2000).

Miltletsels worden gezien bij een kwart van de stompe buiktrauma's in traumaziekenhuizen, maar vaak is hier geen chirurgische behandeling voor nodig. Dit is wel het geval bij een chirurgisch letsel van de milt, wat onder andere kan optreden bij operaties aan maag, darmen, alveesklier en nier. Helaas worden miltbloedingen die tijdens de operatie behandeld worden vaak niet vermeld in wetenschappelijke publicaties maar het aantal wordt geschat 5-10%. Bij deze kleinere miltbloedingen worden hemostatische producten vrijwel altijd toegepast omdat andere technieken om deze miltbloeding te stoppen falen.

We hebben de achtergrond als volgt aangevuld vanwege het tweede deel van de vraag: "Verhoogd bloedverlies en nabloedingen zorgen voor ernstige complicaties zoals shock, multi-orgaanfalen, hartinfarct of overlijden en dragen bij aan een langere operatie- en opnameduur.

"De theoretische voordelen van ████████ boven bestaande producten zijn een vermindering van het bloedverlies en de daaraan gerelateerde complicaties door:

1. Een betere hechting aan orgaan oppervlakten zodat het product beter op zijn plaats blijft en tegendruk kan geven bij een bloeding
2. Het vormen van een gel bij contact met bloed, waardoor de bloeding sneller stopt dan bij 'passieve' stolling.

Daarnaast is het een synthetisch product met een eenvoudiger productieproces, waardoor het uiteindelijke product 5 tot 10 maal goedkoper wordt dan bestaande producten. Omdat ████████ synthetische bestanddelen gebruikt om actieve stolling te bewerkstelligen is het bovendien niet nodig om gebruik te maken van bloeddonaties om humaan fibrinogeen en thrombine te verkrijgen, zoals bij bijvoorbeeld ████████ wel het geval is.

-3.2 De tekst is verplaatst.

De tekst over universitaire centra was toegevoegd om aan te geven dat ook in andere centra geen ervaring is met dit model en dus ook niet gebruik gemaakt kan worden van eventuele know-how. Om verwarring te voorkomen is deze tekst nu weggelaten.

In de komende maanden zullen een aantal prototypes geselecteerd worden op basis van in vitro testen. Verschillen tussen de prototypes zitten vooral in verhouding tussen de hoeveelheid OH en NHS groepen en de dichtheid waarmee het polymeer op de collageenspons wordt gezet. Verschil in deze groepen vertaalt zich naar verschil in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, en de mate van absorptie. We zijn bij de in vitro testen op zoek naar de prototypes met de meest optimale verhouding van deze 3 eigenschappen.

We hebben dit als volgt in de tekst toegevoegd:

b. Prototypeselectie en 'proof of principle'

Bepalen welk prototype van [REDACTED] het meest geschikt is met betrekking tot tijd tot hemostase en hoeveelheid bloedverlies en onderzoeken welke (vreemd lichaam) reacties deze veroorzaakt na aanbrengen op weefsel. De prototypes verschillen in samenstelling en hoeveelheid van het actieve polymeer, waardoor zowel de effectiviteit als de interactie met lichaamsweefsel anders kunnen zijn.

Verschil in deze groepen vertaalt zich naar verschil in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, en de mate van absorptie. We zijn bij de in vitro testen op zoek naar de prototypes met de meest optimale verhouding van deze 3 eigenschappen. We verwachten op basis van ervaringen met verscheidene andere geteste biomaterialen dat de soort (vreemd lichaam) reactie in de rat representatief is voor de mens.

-3.2 Het centrum [REDACTED] is reeds bezocht. Daarom is de tekst als volgt aangepast:

" Binnen onze afdeling en [REDACTED] is er veel ervaring met buikoperaties bij ratten en varkens, dus ook veel ervaring met de benodigde zorg rondom de operaties. Daarom verwachten we geen problemen met de logistieke uitvoer van de experimenten. Er is nog weinig ervaring met de geplande diermodellen voor het gebruik van hemostatische patches. Om die reden hebben we zowel voor het rattenmodel als het varkensmodel pilotexperimenten ingebouwd om de modellen te oefenen en valideren. Op basis van onze ruime ervaring met buikoperaties bij ratten en voorbereidende testen met dode ratten, schatten we in dat de rattenexperimenten goed haalbaar zijn.

Er is een centrum [REDACTED] bezocht om mee te kijken bij een varkensmodel voor hemostase. In [REDACTED] worden kale collageensponsen gemaakt en op verkennende wijze getest. Door mee te kijken met het model bij een varken hebben we een goede indruk gekregen van de uitvoering en haalbaarheid van de proef. Wel denken we dat het nog nodig is om pilotstudies te doen om de geplande diermodellen te oefenen en intern te valideren. Uit onze contacten met [REDACTED] weten we dat ons gepland onderzoek geen onnodige herhaling is. Bovendien is het onderzoek in [REDACTED] 'marketing driven' en worden experimenten daar niet met een wetenschappelijke vraagstelling uitgevoerd.

-3.4.3 De volgende tekst uit de beschrijving van de dierproeven is toegevoegd aan dit deel van het project proposal:

In het pilot deel van dierproef 1 zal worden gestart met groepen P1 en P2 omdat we verwachten dat deze methodes het meest geschikt zijn. Pas als blijkt dat het bloedverlies in deze groepen te groot is, zal de naaldpunctie methode in groep P3 worden getest. Verder

worden in onderdeel b van dierproef 1 eerst de subgroepen gedaan met opoffering op dag 1. Zo kan al een goede eerste indruk worden verkregen van de effectiviteit en weefselreacties. Als het prototype goed lijkt te functioneren en nog terug te vinden is op de laesie, zullen ook de experimenten met de andere subgroepen uitgevoerd worden.

Als uit de experimenten in dierproef 1 blijkt dat het coaten van de collageenspons leidt tot een verbeterde effectiviteit en er geen grote complicaties (zoals forse ontstekingsreacties of abcesvorming) optreden, dan zal het beste [REDACTED] prototype worden uitgekozen en zal hiermee verder worden gegaan in dierproef 2. Als uit dierproef 2 blijkt dat [REDACTED] ook in een groot proefdier werkt en qua effectiviteit minimaal gelijkwaardig is aan bestaande producten, zullen we verder gaan met dierproef 3 en 5. De contaminatie experimenten in dierproef 4 zullen pas worden gestart nadat de lange termijn effecten in dierproef 3 zijn onderzocht en hierbij geen ernstige complicaties zijn opgetreden.

Description of Animal Procedures:

-DAP1, onderdeel A1.

*Bij het gebruik van een hemostatische patch kiezen we voor een overlap van minimaal 1 cm rondom de leasie/bloeding wat 50% is van wat aangehouden wordt bij mensen. Bij een kleinere overlap is de vertaalslag naar mensen onzeker. 1 cm overlap wil zeggen dat de stukken patch minimaal 2 bij 2 cm moeten zijn en dit stuk op een toegankelijk stuk leverlob moet worden gepositioneerd. Een muizenlever is hiervoor te klein. We hebben dit in de tekst als volgt aangepast:

De redenen dat we voor een rattenmodel met leverbloeding hebben gekozen zijn:

- Het bereiken van hemostase van leverbloedingen is de belangrijkste toepassing van [REDACTED]. Daarom gebruiken we bijvoorbeeld geen milt-, of nierletsels. Bovendien zijn milt en nier bij ratten dermate klein dat er onvoldoende ruimte is om de patch met een adequate marge rondom een bloeding te positioneren. Het gebruik van miltletsels zal onderzocht worden met een varkensmodel in dierproef 3.4.4.2. Onderzoek van miltletsel is klinisch relevant omdat de milt het meest voorkomende orgaan is dat wordt beschadigd bij een stom buiktrauma (auto-, fiets-, sportongeval)
- Onze afdeling heeft het meeste ervaring met buikoperaties bij ratten.
- Uit ex vivo proeven is gebleken dat de afmeting van een rattenlever geschikt is voor het aanbrengen van kleine stukjes [REDACTED]. Bij gebruik van muizenlevers zouden de afmetingen van [REDACTED] teveel moeten worden verkleind zodat er onvoldoende overlap van de patch rondom de bloeding is en er daardoor te weinig ruimte is voor de relatief te grote patch goed te positioneren.
- Omdat het doel van dit onderdeel is om de effectiviteit en weefselreacties van de prototypes te verkennen, en niet om de resultaten direct te vertalen naar de mens, verkiezen we in dit onderdeel de praktische kant van een klein proefdier boven de translationele waarde van grote proefdieren (varkens).

*Dit is een pilot experiment om de beste methode voor de overige dierproeven te onderzoeken. Zoals we een stukje verderop in de tekst hadden beschreven, maken we alleen gebruik van de naaldpunctie in het geval dat de overige twee methoden niet voldoen:

In het pilot deel zal worden gestart met groepen P1 en P2 omdat we verwachten dat deze methodes het meest geschikt zijn. Pas als blijkt dat het bloedverlies in deze groepen teveel is, zal de naaldpunctie methode in groep P3 worden getest.

Ter verduidelijking is de volgende tekst toegevoegd:

De methodes om de bloeding te induceren die we zullen testen zijn:

1. Verwijderen stukje lever. Lijkt meer op kliniek bij leverresecties en waarschijnlijk voldoende bloedverlies, maar moeilijk om te standaardiseren (Schmiedt, Köhler et al. 2012)
2. Biopsie laesie. Goed te standaardiseren en praktische grootte van bloeding, maar niet eerder beschreven in literatuur.

We beginnen eerst met deze twee methoden, mocht blijken dat er te toch teveel bloedverlies ontstaat, dan testen we de volgende:

3. Naaldpunctie. Goed te standaardiseren, klinisch relevant voor een peroperatieve naald biopsie van de lever bij diagnostiek naar diepe leverafwijkingen en tumoren, mogelijk gering bloedverlies. (Murakami, Yokoyama et al. 2008)

*De alinea is als volgt aangepast:

"Elke groep in de pilot zal worden onderverdeeld in de volgende subgroepen:

a: aanbrengen van kale collageensponzen (negatieve controle)

b: aanbrengen van ██████████ ('positieve' controle).

Als primaire uitkomsten zal de tijd tot hemostase en de hoeveelheid bloedverlies worden bepaald. Het model waarbij een dusdanige bloeding optreedt zodat we het product voldoende kunnen testen, zonder dat het dier lijdt aan te veel bloedverlies (>1.5mL of >10% van circulerend volume), zullen wij in vervollexperimenten gaan gebruiken.

*Uitleg over de verschillen tussen de prototypes is hierboven weergegeven. De functie van groep 1 is om de hoeveelheid bloedverlies nauwkeurig te kunnen bepalen. Verder hebben de subgroepen een duidelijke naam gekregen en zijn als volgt weergegeven:

Afhankelijk van de pilot resultaten zal de meest geschikte 'leverletsel-methode' in deze experimenten worden gebruikt. Per groep zal er een verschillend prototype van ██████████ of een controleproduct worden getest. De primaire uitkomsten zijn de hoeveelheid bloedverlies en de tijd tot het bereiken van hemostase. Na het bereiken van hemostase zal de buik worden gesloten. Als secundaire uitkomst zal worden gekeken naar de weefselreacties op korte termijn met behulp van beschrijvende histologie. De dieren zullen op dag 1, 3 of 7 (subgroep a,b,c) worden opgeofferd en na inspectie van de buikholte op eventuele nabloedingen zal er weefsel worden afgenomen.

Groep 1 (a,b,c): controle met gazen, om hoeveelheid bloedverlies nauwkeurig te bepalen (negatieve controle)

Groep 2 (a,b,c): controle met ██████████ h, als referentieproduct^

Groep 3 (a,b,c): controle met kale collageenspons, om meerwaarde van polymeren te bepalen

Groep 4 (a,b,c) - 15 (a,b,c): ██████████

Specifieke invulling van prototypes zullen nog nader worden bepaald. Verschillen tussen de prototypes zitten vooral in verhouding tussen de hoeveelheid OH en NHS groepen en de

dichtheid waarmee het polymeer op de collageenspons wordt gezet. Dit uit zich in de verschillende groepen in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, de mate van absorptie.

^omdat [REDACTED] (huidige standaard) dikker is dan [REDACTED] en daarnaast minder flexibel en aanzienlijk duurder is, achten wij het minder geschikt om als controleproduct te gebruiken in dit rattenmodel. In dierproef 2 (varkensmodel) zal het wel gebruikt worden als controleproduct.

-DAP1, onderdeel A2

*Bij het bepalen van de humane eindpunten is lichaamstemperatuur niet noodzakelijk. Dit is te bepalen door andere kenmerken. De tekst bij DAP1 onderdeel J is aangepast.

-DAP1, onderdeel A3.

*De subgroepen zijn nu duidelijker weergegeven in zowel de projectproposal als de DAP's

*Er was ook in deze powerberekening gebruik gemaakt van een bonferroni-correctie, dit was echter niet weergegeven in de tekst. De tekst is als volgt aangepast:

De groepsgrootte zal door middel van een powerberekening worden bepaald. Daarbij zal gebruik gemaakt worden van sample size calculator op:

<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>.

De benodigde sample size zal worden berekend om te bepalen of het [REDACTED]-prototype (groep 4-15) zorgt voor een significant snellere hemostase ten opzichte van de huidige standaard (groep 2). Omdat daarnaast ook zal worden vergeleken met groep 3, wordt er een bonferroni correctie toegepast voor 3 vergelijkingen. Omdat groep 1 enkel wordt gebruikt als negatieve controle, zal hiervoor niet worden gecorrigeerd. Ook wordt er per prototype niet verder gecorrigeerd voor de mogelijke extra vergelijkingen, omdat de vergelijking met de gouden standaard de belangrijkste blijft.

-DAP1, onderdeel B

*De tekst is als volgt aangevuld:

"We zullen gebruik maken van mannelijke Wistar ratten omdat onze afdeling de meeste ervaring heeft met buikoperaties bij deze dieren, en er a priori geen reden of tegenstrijdige literatuur is om hiervan af te wijken. Het is bekend dat er verschillen zijn in SPONTANE bloedstolling tussen mannen en vrouwen, en dat geslachtshormonen hier een belangrijke rol bij spelen (Mendelsohn, Science 2005). Dit is met name relevant voor chronische atherosclerotische hart- en vaatziekten (meer arterieel vaatlijden bij mannen). Bij vrouwen is het risico op veneuze thrombose hoger (pilgebruik, roken) Er is geen verschil in de literatuur in het stollingsproces tussen man en vrouw bij ACUTE bloedingen. Tevens, omdat [REDACTED] werkt door middel van gelvorming van plasma-eiwitten die gelijk zijn bij man en vrouw, zijn eventuele kleine verschillen in de stollingscascade niet relevant. In deze fase, waarin we prototypes en producten onderling vergelijken, vinden we het vooral belangrijk dat de groepen zoveel mogelijk gelijk zijn. Bij de varkensexperimenten maken we gebruik van vrouwelijke varkens vanwege 'handling' van de dieren. Ook hier verwachten we geen sexe specifieke verschillen in stolling na chirurgisch geïnduceerde bloedingen.

*Alleen onder strikte omstandigheden hadden wij dieren willen hergebruiken. Echter, omdat de uitkomst van dit experiment de opzet van de volgende experimenten bepaald, en we hierin geen risico willen lopen, nemen we hier het advies van de commissie over en zullen geen gebruik maken van dieren uit eerdere studies. Het antwoord is veranderd bij DAP1 onderdeel C.

-DAP1, onderdeel D:

*De tekst is als volgt aangepast:

Vervanging& vermindering

In de ontwikkelingsfase van ██████ is gebruik gemaakt van in vitro en ex vivo experimenten (o.a. met bloed van mensen en ratten) om tientallen prototypes te testen en hun effectiviteit in te schatten. Daarmee is het gebruik van proefdieren voor dit doel vermeden. 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 en ratten in de volgende onderdelen. Verder wordt het aantal proefdieren beperkt doordat er meerdere laesies per dier worden aangebracht.

-DAP1, onderdeel H

*De tekst is aangepast:

Voor (gas)anesthesie wordt gebruikt gemaakt van isofluraan.

Voor analgesie wordt gebruik gemaakt van buprenorphine

-DAP1, onderdeel I.

*Het herstel van het weefsels is iets anders dan de klinische conditie van de rat, voor de duidelijkheid hebben we de tekst als volgt aangepast:

In experiment b is er na de buikoperatie 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 er (nat) voedsel in de kooi gelegd en worden er drinkflessen met lange tuiten geplaatst om het eten en drinken te vergemakkelijken. Na twee tot drie dagen zal de klinische conditie van de ratten genormaliseerd zijn, dat zich uit in een herstellend gewicht en activiteiten patroon.

-DAP2, onderdeel A1

*In DAP1 is onderdeel A1 aangepast:

"De redenen dat we voor een rattenmodel met leverbloeding hebben gekozen zijn:

- Het bereiken van hemostase van leverbloedingen is de belangrijkste toepassing van ██████ Daarom gebruiken we in deze fase geen milt- of nierletsels." Bovendien zijn milt en nier bij ratten dermate klein dat er onvoldoende ruimte is om de patch met een adequate marge rondom een bloeding te positioneren. Het gebruik bij miltletsels zal onderzocht worden met een varkensmodel in dierproef 3.4.4.2". Onderzoek van miltletsel is klinisch relevant omdat de milt het meest voorkomende orgaan is dat wordt beschadigd bij een stomp buiktrauma (auto-, fiets-, sportongeval)

In DAP2 onderdeel A1 is de tekst aangevuld:

- Door de grootte van de milt en lever van varkens kunnen er meerdere samples per dier worden getest. Met name de milt is erg lang bij varkens en daardoor zeer geschikt. Het gebruik bij miltletsels zal onderzocht worden in dit model, omdat onderzoek van miltletsel klinisch relevant is: de milt is het meest voorkomende orgaan dat wordt beschadigd bij een stomp buiktrauma (auto-, fiets-, sportongeval) Het orgaanoppervlak van de milt lijkt bovendien erg veel op dat van andere solide organen, waaronder de lever. Door ook de varkensmilt te gebruiken kan er meer informatie worden verkregen en worden er zo weinig mogelijk dieren gebruikt.

*De tekst is als volgt aangevuld:

"De redenen dat we voor een varkensmodel met lever- en miltbloeding hebben gekozen zijn: - om te bepalen of bij mensen veilige hemostase kan worden bereikt is het nodig dit te testen op orgaanlaesies met een klinisch relevante grootte en anatomie en vergelijkbaar stollingsmechanisme; hiervoor zijn varkensorganen geschikt. Bij leveroperaties ontstaan er grote bloedende resectievlakken, die voor een groot deel met electrocoagulatie kunnen worden behandeld. Daarbij blijven er echter vaak enkele bloedende plekken over die een kleinere diameter (1-2cm) hebben, maar die wel hardnekkig kunnen blijven bloeden. Bij het behandelen van dergelijke laesies met een patch is er een niet bloedende marge van zo'n 1 cm rondom nodig. Rattenlevers zijn weer net te klein om patches van 3x3cm (overlap 1 cm bij defect 2 cm) goed te positioneren.

*De tekst is als volgt aangevuld:

Daarbij zullen zowel op de milt als op de lever 8-10 laesies (afhankelijk van orgaangrootte) van 1cm diameter worden gemaakt. Omdat elke laesie meteen behandeld wordt met een patch, de laesies kort achter elkaar worden gemaakt en de lever en milt parenchymatueze organen zijn waarbij de bloedingen weinig afhankelijk van bloeddrukwisselingen (als gevolg van eerder bloedverlies) zijn, verwachten we niet dat het opgetreden bloedverlies van de eerste laesies van invloed is op de laatst gemaakte laesies. Ook bij het bijgewoonde experiment ██████ was dit niet het geval. Uiteraard zal dit in het pilot experiment worden gecontroleerd. We verwachten dat het bloedverlies van de laesies onderling wel zal verschillen doordat de onderliggende vaatanatomie per laesie anders is. Dit wordt ondervangen door de patches gerandomiseerd aan te brengen op de laesies.

*De 5 materialen worden gerandomiseerd per laesie. Er wordt gebruik gemaakt van blokrandomisatie, dus per dier wordt elk materiaal twee keer gebruikt. Dit hebben we toegevoegd aan de tekst.

*We hebben de tekst als volgt aangepast:

Gewicht: tussen 30 en 80kg. Eerdere hemostase experimenten zijn uitgevoerd met varkens vanaf 30kg (Lewis, ISRN Surgery 2014). Het bijgewoonde experiment ██████ werd uitgevoerd met een varken van 40kg. De levergrootte was daarbij geschikt voor het uitvoeren van de experimenten. In ██████ wordt vooral gewerkt met varkens tussen 40 en 80kg. We kiezen ervoor om geen gebruik te maken van varkens die uitgegroeid zijn, omdat deze met een gewicht tussen de 120 en 200kg zeer moeilijk te hanteren zijn. Voor zover bekend verandert de bloedstolling nauwelijks vanaf de geboorte en is er dus geen reden om oudere dieren te gebruiken.

*In lijn met de opmerkingen en vragen over de eerste twee experimenten hebben we ook de overige experimenten aangepast en aangevuld.

Hierbij willen we de commissie graag op de hoogte stellen dat er nog een onderzoeker (Edwin Roozen, artikel 9) is toegevoegd aan het project.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- Datum: 21-10-2015
- Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-In de beantwoording van de vraag over onderdeel 3.2, derde vraag stellen de onderzoekers dat zij twee zinnen hebben toegevoegd aan de projectaanvraag. De tweede zin (We zijn bij de in vitro testen...-...van deze 3 eigenschappen) ontbreekt in de projectaanvraag. Zij worden verzocht deze zin toe te voegen.

Description of Animal Procedures:

-Het is de commissie niet duidelijk wat de onderzoekers bedoelen bij de beantwoording van de vraag over DAP1, onderdeel B, eerste vraag. Als eventuele kleine verschillen in de stollingscascade niet relevant zijn, waarom willen de onderzoekers dan toch alleen mannelijke dieren gebruiken? Welke rol spelen de verschillen in spontane bloedstolling tussen mannen en vrouwen in het gehanteerde diermodel? De commissie verzoekt u deze paragraaf te herformuleren tot een coherente tekst met valide argumenten waaruit blijkt waarom de onderzoekers bij voorkeur mannelijke dieren gebruiken, of de verwijzingen naar mannelijke dieren te schrappen in DAP1, 3 en 4, onderdeel B.

-DAP3 en DAP5, A3: Voor het met een voldoende mate van zekerheid opsporen van complicaties die in 10% van de gevallen voorkomen zijn (veel) meer dieren nodig. De onderzoekers worden daarom verzocht de laatste zin te verwijderen.

-DAP4, A2: Waarom willen de onderzoekers dit model gebruiken om infectie in de buik te induceren? De commissie verzoekt u een referentie toe te voegen van uzelf en een andere onderzoeksgroep waarin dit model wordt gebruikt.

- Datum antwoord: 24-11-2015
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-De tweede zin ontbrak inderdaad in de projectaanvraag, deze is nu toegevoegd aan het project:

Bepalen welk prototype van [REDACTED] het meest geschikt is met betrekking tot tijd tot hemostase en hoeveelheid bloedverlies en onderzoeken welke (vreemd lichaam) reacties deze veroorzaakt na aanbrengen op weefsel. De prototypes verschillen in samenstelling en hoeveelheid van het actieve polymeer, waardoor zowel de effectiviteit als de interactie met lichaamsweefsel anders kunnen zijn.

Verskil in deze groepen vertaalt zich naar verschil in hoeveelheid plakkracht, snelheid van gelvorming, en de mate van absorptie. We zijn bij de in vitro testen op zoek naar de prototypes met de meest optimale verhouding van deze 3 eigenschappen. We verwachten op basis van ervaringen met verscheidene andere geteste biomaterialen dat de soort (vreemd lichaam) reactie in de rat representatief is voor de mens.

Description of Animal Procedures:

-In DAP 4 maken we gebruik van een diermodel waarbij wij al veel ervaring hebben. Bij dit model hebben we altijd alleen mannelijke dieren gebruikt. Daardoor leek het ons zinvol ook bij de andere experimenten met de ratten alleen mannelijke dieren te gebruiken.

Er zijn op voorhand echter geen aanwijzingen dat er verschillen zijn tussen mannelijke en vrouwelijke ratten ten aanzien van de werking van de patch. Ook de extrinsieke stolling verschilt niet wezenlijk tussen mannetjes en vrouwtjes ratten. Daarom vervalt op voorhand het verzoek voor alleen mannetjes ratten. Mocht na het eerste experiment blijken dat een heroverweging van deze keuze noodzakelijk is omdat er onverwacht toch een verschil tussen mannelijke en vrouwelijke ratten optreedt, willen wij dit graag terugkoppelen aan de DEC/CCD en de rest van het experiment uitvoeren met ratten van 1 sexe. Dit bespaart uiteindelijk dieren.

In DAP1, 3 en 4 hebben we alle verwijzingen naar het gebruik van mannelijke dieren verwijderd.

-DAP3 en DAP5, A3:We nemen het advies van de commissie hier over en hebben in beide experimenten de zin verwijderd:

(DAP 3) Derhalve verwachten we dat

een groeps grootte van 10 dieren voldoende proportionele waarde zal geven om het afbraakpercentage op de verschillende tijdstippen te bepalen.

(DAP 5) Als dat wel het geval is schatten we in 10 operaties nodig te hebben om te bewijzen dat het gebruik van [REDACTED] ook daadwerkelijk geschikt en veilig is.

- DAP4, A2: Wij hebben DAP4, A2 als volgt aangepast:

Voor het bestuderen van de invloed van contaminatie zullen we gebruik maken van een model waarbij er bacteriën in de buikholte worden ingebracht. Het model betreft het 'Inoculatiemodel' waarbij een combinatie van fecale vezels en een bekende hoeveelheid van twee soorten bacteriën (E.coli en B.fragilis) in de buikholte wordt gespoten. Wij gebruiken dit model omdat dit goed te standaardiseren is en wij een ruime en recente ervaring mee hebben. [REDACTED]

[REDACTED] Door dit algemeen geaccepteerde model (Erginel et al. TJTES 2014; Rosman et al. Eur.J.Surg 1999) te gebruiken hoeven geen extra dieren gebruikt te worden om de onderzoekers te trainen en een nieuw model op te zetten. Bij dit model wordt er een uur na de initiële contaminatie een laparotomie gedaan onder algehele narcose (isofluraan, zie onder H voor details), ...

- 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 'onderzoeken of ██████, een nieuwe, goedkope, grotendeels synthetische, hemostatische patch, effectief en veilig is voor bloedingen in de buikholte waarbij reguliere en eenvoudige behandelmethodes (hechting, electrocoagulatie) minder effectief of niet mogelijk zijn'. De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken welke eigenschappen van ██████ bijdragen aan goede bloedstelping in vivo, en of het meest geschikte prototype effectief en veilig is om aangebrachte laesies in ratten en varkens te behandelen. Ook wordt duidelijk of dit prototype goed wordt afgebroken, er geen nadelige effecten door het gebruik op de lange termijn ontstaan en of het gebruikt kan worden in omstandigheden waarbij contaminatie met bacteriën regelmatig voorkomt. Voorts wordt duidelijk of ██████ geschikt is om grotere bloedingen te stoppen in varkens. Deze resultaten zullen bijdragen aan het ontwikkelen van een goedkopere hemostatische patch zonder humane of dierlijke producten voor gebruik bij patiënten. Dergelijke patches zijn belangrijk om aanzienlijk bloedverlies te voorkomen. Traumatische letsels van solide organen en andere structuren in de buik- en bekkenholte, en operaties waarbij ernstige bloedingen kunnen optreden, zoals leverresecties en miltoperaties, gaan vaak gepaard met veel bloedverlies. Verhoogd bloedverlies en nabloedingen dragen bij aan een langere operatie- en opnameduur, en kunnen voor ernstige complicaties zorgen, zoals shock, multi-orgaanfalen, hartinfarct of overlijden. De onderzochte patch vormt mogelijk een goed alternatief zonder de nadelen (hoge kosten, niet-synthetisch) van het huidige product. De DEC vindt de kennis die wordt vergaard met dit onderzoek en het ontwikkelen van een dergelijke patch van 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 met buikoperaties bij ratten, maar nog niet bij varkens. Ook is er nog geen ervaring met het gebruik van hemostatische patches. De benodigde ervaring wordt opgedaan door mee te kijken bij collega's die dergelijke operaties vaak uitvoeren, en door eerst pilotexperimenten uit te voeren. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het bloedstelpende effect van de onderzochte patches bij ratten en varkens, en over de veiligheid, de effecten op langere termijn, het gebruik bij infectiegevaar en het gebruik bij grote bloedingen. Door een aantal factoren ook bij varkens te testen, wordt de translationele waarde van het onderzoek vergroot.
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 benodigde operaties en het daarmee gepaard gaande bloedverlies. Het ongerief als gevolg van de operaties onder terminale anesthesie is terminaal. De DEC schat het ongerief voor de ratten als gevolg van de benodigde subcutane

injecties, de bloedafnames, en de verdoving in als licht. Het ongerief als gevolg van de buikoperatie en de herstelperiode daarna, en de subcutane plaatsing van patches schat de commissie in als matig. De commissie is van mening dat het contaminatiemodel tot matig ongerief voor de meeste dieren leidt, en tot ernstig ongerief voor de dieren die een buikvliesontsteking ontwikkelen (ongeveer 20% van de dieren in dit experiment). Het cumulatief ongerief voor de ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als terminaal voor 11,5% van de dieren, matig voor 85% van de dieren en ernstig voor 3,5% van de dieren. De DEC schat het ongerief voor de varkens als gevolg van de buikoperatie en de herstelperiode daarna in als matig. Het ongerief als gevolg van de operaties onder terminale anesthesie is terminaal. Het cumulatief ongerief voor de varkens in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als terminaal voor 31% van de dieren en matig voor 69% 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. De onderdelen van het project die in vitro onderzocht kunnen worden zijn al afgerond. Voor beantwoording van de resterende vraagstelling zijn proefdiermodellen noodzakelijk. Reacties op een vreemd lichaam en de afbraak daarvan zijn alleen in dieren goed te bestuderen. Vanwege overeenkomsten in grootte van organen tussen varkens en mensen is het gebruikelijk om chirurgische methodes of materialen die bij operaties gebruikt worden te testen bij varkens alvorens toestemming te vragen voor een klinische trial met patiënten. De commissie is het eens met deze gang van zaken.
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 het uitvoeren van pilotexperimenten en de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolggexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De onderzoekers willen in de beginfase 12 verschillende prototypes uittesten. Gezien het aantal variabelen is de commissie van mening dat dit een redelijk aantal is om het beste prototype te kunnen selecteren. De aanvrager heeft het beschreven diermodel tot nu toe altijd uitgevoerd met mannelijke dieren. Om het fokoverschot te verminderen zal hij gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, aangezien hij op voorhand geen reden heeft om aan te nemen dat het geslacht van de dieren de werking van de patch wezenlijk zal beïnvloeden. Mocht na het eerste experiment blijken dat het geslacht (mogelijk) toch invloed heeft op de werking en dit een goede interpretatie van de resultaten verhindert, dan zal hij een met redenen omkleed verzoek tot het gebruik van dieren van één sexe indienen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 265 ratten en 32 varkens.
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. Voor de terminale experimenten is geen verdere verfijning mogelijk. Het contaminatiemodel gaat gepaard met ernstig ongerief voor een deel van de dieren, omdat zij een gegeneraliseerde peritonitis ontwikkelen. Er bestaat helaas geen verfijnder model voor peritonitis. Aangezien deze patches veel in de buikholte zullen worden toegepast, waardoor er een reële kans op infectie is, is de commissie van mening dat het noodzakelijk is om de veiligheid

van de patch onder deze omstandigheden te onderzoeken. 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 bloedstelpende effect van (verschillende eigenschappen van) synthetische hemostatische patches, en over de veiligheid, de effecten op langere termijn, het gebruik bij infectiegevaar en het gebruik bij grote bloedingen. De resultaten zullen onder andere een indicatie geven of deze inzichten aanleiding zijn voor het uittesten van deze nieuwe patches bij patiënten. Het belang van meer inzicht in de werking van hemostatische patches en het beschikbaar komen van een alternatieve, volledig synthetische hemostatische patch, acht de DEC substantieel, gezien de nadelen van de op dit moment beschikbare hemostatische patches. De resultaten uit dit onderzoek kunnen op korte termijn vertaald worden naar klinische toepassingen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 69% van de varkens matig ongerief zal ondervinden, 85% van de ratten matig ongerief zal ondervinden en 3,5 % van de ratten ernstig ongerief zal ondervinden als gevolg van de operaties in combinatie met de benodigde handelingen. De overige dieren worden gebruikt in terminale experimenten, waarbij het ongerief beperkt blijft tot het induceren van anesthesie. 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
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015348

Bijlagen

2

Datum 16 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015348. 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: Arts in opleiding tot chirurg
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 (628)
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: 14 januari 2015
Geplande einddatum: 14 januari 2021
Titel project: Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties
Titel niet-technische samenvatting: Het gebruik van GAT-Patch om te zorgen voor snellere bloedstolling bij operaties
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:

14 december 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
AVD103002015348

Bijlagen

2

Datum 16 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 december 2015

Vervaldatum: 15 januari 2016

Factuurnummer: 15700348

Ordernummer: 040823-461220/2015-0012/

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015348	€ 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
[Redacted]

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
AVD103002015348

14 JAN. 2016

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 15 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties" met aanvraagnummer AVD103002015348. 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 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 "Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 januari 2016 tot en met 13 januari 2021. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een project maximaal voor 5 jaar kan worden vergund. 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. In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2021 plaatsvinden. 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 14 december 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

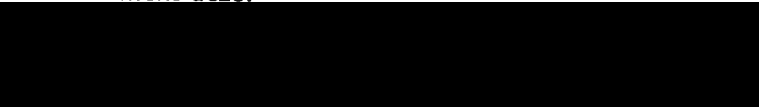
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

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, [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 januari 2016 tot en met 13 januari 2021, voor het project "Het gebruik van GAT-Patch als hemostatische sealant tijdens operaties" met aanvraagnummer AVD103002015348, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Arts in opleiding tot chirurg. Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 december 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 december 2015, ontvangen op 15 december 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1 Hemostasemodel rat	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wu (Wistar)	180	Matig / moderate	pilot: terminaal (17%); interventiegroepen: matig (83%)
2 Hemostasemodel varken	Varkens (<i>Sus scrofa domestica</i>) / Z- of Z/N-lijn	22	Matig / moderate	
3 Afbraak en langetermijneffecten rat	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wu (Wistar)	40	Matig / moderate	
4 Veiligheid bij contaminatie rat	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wu (Wistar)	45	Ernstig / severe	
5 Ernstige bloedingen varken	Varkens (<i>Sus scrofa domestica</i>) / Z- of Z/N-lijn varkens	10	Terminaal / non-recovery	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de go/no go momenten, om door te gaan naar de volgende fase, 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 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.

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 april 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.