

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
nr.	document NTS 2016774	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Project proposal				x			x		
4	Project proposal aangepast				x			x		
5	beschrijving dierproef				x			x		
6	beschrijving dierproef aangepast				x			x		
7	beschrijving dierproef aangepast2				x			x		
8	bijlage figuren			x						
9	bijlage figuren aangepast			x						
10	DEC advies				x		x	x		
11	ontvangstbevestiging				x		x	x		
12	aanhouden beoordelen1				x		x	x		
13	mail aanvullende informatie 1				x		x	x		
14	toelichtingsbrief				x	x	x	x		
15	aanhouden beoordelen2				x		x	x		
16	mail aanvullende informatie2				x		x	x		
17	brief toelichting2				x		x	x		
18	Advies CCD aan bestuur		x							x
19	Beschikking				x		x	x		

15 DEC. 2016



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11400
		<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	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	64156338
		Straat en huisnummer	de Boelelaan 1117
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>	Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	[REDACTED]
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	[REDACTED]
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	[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 | 1-1-2017
- Einddatum | 1-1-2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bestudering van de ontstaanswijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bestudering van de ontstaanswijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
- Postadres | Amsterdam | Nederland
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935

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.

* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.

Inkoopordernummer:

Factuuradres:

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

Amsterdam

12-12-2016



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

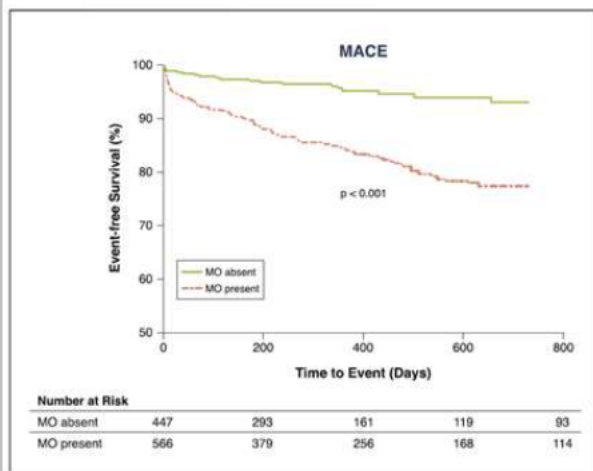
3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Vandaag de dag zijn hart- en vaatziekten nog steeds doodsoorzaak nummer 1 wereldwijd en naar verwachting zal het aantal patiënten met kransslaglijden in de toekomst nog verder toenemen. De meest heftige manifestatie hiervan is het acuut myocardinfarct, waarvoor revascularisatie middels primaire percutane coronaire interventie (PCI; dotterbehandeling) de gouden standaard is. De PCI heeft de mortaliteit van een hartinfarct teruggebracht naar minder dan 5%. Echter, in 40-50% van de patiënten welke voor een acuut myocardinfarct worden behandeld middels PCI blijft –ondanks succesvolle revascularisatie– een deel van het vaatbed suboptimaal geperfundeed. Dit betreft voornamelijk de capillairen en wordt *No-Reflow* genoemd. No-reflow kan het beste zichtbaar worden gemaakt met MRI en is gerelateerd met een verminderde myocardiale perfusie. Daarnaast gaat de aanwezigheid van no-reflow gepaard met een verhoogde morbiditeit en mortaliteit (figuur 1).



Figuur 1. Aanwezigheid van no-reflow, hier microvasculaire obstructie (MO) genoemd, gaat gepaard met significante toename in Major Adverse Cardiac Events (MACE), ten opzichte van de afwezigheid van MO.

Bron: Van Kranenburg et al, JACCci, 2014

Helaas heeft uitgebreid onderzoek nog niet aangetoond wat de exacte oorzaken zijn voor no-reflow en is er nog geen adequate therapie beschikbaar. Aanvankelijk werd gedacht dat tijdens de PCI kleine bloedstolsels (microthrombi) los raakten en stroomafwaarts vastliepen in de capillairen en een verstopping veroorzaakten (microëmbolisatie). Echter hebben verschillende mogelijke therapieën hiertegen, zoals (extra) bloedverdunders en thrombosuctie in patiënten geen voordeel laten zien.

Naast microëmbolisatie zijn er nog een aantal mechanismes voorgedragen, welke no-reflow kunnen verklaren. Voorbeelden hiervan zijn vochtophoping (oedeem) en de influx van immuuncellen, maar solide bewijs hiervoor ontbreekt.

Recent gepubliceerd onderzoek [redacted] heeft echter aangetoond dat ter plaatste van no-reflow, de microvasculatuur ernstig beschadigd is. In het centrum van het no-reflowgebied bleken de endotheelcellen zelfs volledig verdwenen te zijn. Daarbij waren rode bloedcellen massaal buiten de bloedbaan getreden. Dit laatste wordt ook wel intramyocardiale

hemorragie of IMH genoemd. Het optreden van IMH staat in contrast met de eerdere hypothese dat bloedpropjes verantwoordelijk zijn voor het no-reflow fenomeen en zet vraagtekens bij het huidige gebruik van bloedverdunders rondom een dotterprocedure.

[redacted]

Dit betekent dat er na het openen van het afgesloten bloedvat, therapeutische ruimte bestaat om schade aan de microvasculatuur te beperken. [redacted] omdat hier in de cardiovasculaire wetenschap geruime ervaring mee is, ratten voldoende groot zijn om een van de coronairen chirurgisch af te binden en relatief lage kosten met zich mee brengen. Daarnaast komt de anatomie van het hart in grote mate overeen met dat van de mens. Zodoende zijn de resultaten goed vertaalbaar naar de humane situatie.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Onderzoeksdoel:

Dit onderzoeksproject richt zich op het optreden van IMH en heeft als hoofddoel te onderzoeken welke

mechanismen verantwoordelijk zijn voor endotheelschade en in hoeverre enkele veel voorgeschreven medicijnen (o.a. bloedverdunders) van invloed zijn op het optreden van IMH. Om dit te onderzoeken zijn een aantal onderzoeksvragen/subdoelen opgesteld.

- 1) Wat is het effect van endotheelmodulerende middelen op het optreden van vaatlekkage en intramyocardiale hemorragie in een cardiaal ischemie-reperfusiemodel.
- 2) Wat is het effect van externe factoren (medicatie) op het optreden van vaatlekkage en intramyocardiale hemorragie in een cardiaal ischemie-reperfusie model.

Haalbaarheid:

Daarnaast zal bij de uitvoering van de experimenten en de hier opvolgende analyses nauw worden samengewerkt met de afdelingen . Hierdoor kunnen verschillende expertises worden gecombineerd voor een optimaal resultaat. Het gebruikte hartinfarctmodel met ratten is veel beschreven in de literatuur voor onderzoek naar hart- en vaatziekten, waardoor resultaten goed vergelijkbaar zijn. Vanuit een praktisch oogpunt wordt de haalbaarheid vergroot doordat alle benodigde apparatuur aanwezig en biedt het lokale universitair proefdiercentrum alle benodigde faciliteiten voor een succesvolle uitvoering.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang

Voordat er een adequate behandeling tegen IMH ontwikkeld kan worden, is het van groot belang dat eerst de basismechanismen wordt doorgrond, welke verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van IMH. Hiervoor is gedegen kennis nodig van de verschillende processen die spelen in het hart rondom een dotterbehandeling.

Maatschappelijk belang

Nederland telt 1 miljoen hart- en vaat patiënten en jaarlijks krijgen er 30.000 mensen een hartinfarct in ons land. Dat zijn ongeveer 80 mensen per dag. Het merendeel van deze patiënten zal een dotterbehandeling ondergaan, en daarbij mogelijk IMH ontwikkelen. Indien IMH voorkomen of genezen kan worden, is dit van groot maatschappelijk belang.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Diermodel

Om de ontstaanswijze van IMH te onderzoeken zullen wij gebruik maken van een ischemie-reperfusiemodel. De humane situatie, waarbij IMH enkel wordt gezien na een myocardinfaarct (ischemie), met aansluitende een succesvolle revascularisatie (reperfusie) wordt goed nagebootst door dit diermodel.

Daarnaast zullen wij aan het eind van het experiment de rattenharten ex-vivo perfunderen en laten functioneren in een Langendorff opstelling. Dit stelt ons in staat om in een controleerde omgeving vaatlekkage en hartfunctie te kwantificeren.

Ischemie- en reperfusieduur

In de humane situatie is een ischemieduur van ≤ 60 minuten relatief kort, waarbij de meeste myocardiale schade in de eerste 2-3 uur van ischemie wordt veroorzaakt . In ratten is de duur waarbij maximale myocardiale schade optreedt echter korter; de meeste schade treedt al op in de eerste 60 minuten van ischemie, waarna een plateaufase wordt bereikt .

In dit model passen wij daarom een maximale ischemieduur toe van 60 minuten.

Diergroepen

In dit project bestuderen we twee categorieën middelen, welke allebei mogelijk van invloed zijn op het optreden van vaatlekkage en intramyocardiale hemorragie. Deze twee categorieën kunnen elk worden onderverdeeld in meerdere groepen middelen. Elke groep grijpt (binnen de desbetreffende categorie) op een andere manier aan op vaatpermeabiliteit en/of IMH. Door deze groepen met elkaar te vergelijken, wordt inzicht verkregen in de ontstaanswijze van vaatlekkage en IMH. Daarnaast is het binnen een aantal van deze groepen mogelijk meerdere soorten middelen te onderscheiden, welke elk net op een andere wijze werken. We zullen dus ook binnen de groepen kijken naar welke soort middel het meest gunstig effect heeft. Dit geeft niet alleen extra informatie over de pathofysiologie, maar helpt ook een keuze te maken in eventuele vervolgstudies.

Hieronder staat de twee categorieën, met de hieronder vallende groepen en soorten middelen beschreven. Daarbij is per groep aangegeven hoeveel soorten middelen er maximaal onderzoeken zullen worden. Een schematisch overzicht is tevens in figuur 2 in de Bijlage Figuren weergegeven.

In de eerste categorie richten we ons op de microcirculatie, omdat deze het meest kwetsbaar is en als eerste is aangedaan bij een myocardinfarct. De microcirculatie bestaat vrijwel volledig uit een enkele laag endotheelcellen, welke de barrière vormt tussen de bloedbaan en de hartspier. Wanneer het endotheel beschadigd raakt, zal de barrièrefunctie afnemen, waardoor er IMH kan optreden. Om te onderzoeken welke interne factoren precies bijdragen aan het optreden van IMH, zullen we in een reeks experimenten ingrijpen op verschillende factoren waarvan bekend is dat zij een rol spelen bij endotheelfunctie en/of vaatpermeabiliteit. De middelen die wij hiervoor zullen gebruiken zijn onderverdeeld in groepen, welke hieronder staan opgenoemd. Gezien het feit dat onze focus primair ligt op de interne factoren die IMH veroorzaken, zijn in deze categorie meer groepen opgenomen dan in de tweede categorie.

1. *Proteïnekinaseremmers*. Proteïnekinaseremmers zijn er in vele vormen en kennen een tal van indicaties, waaronder de behandeling van kanker. Van een aantal van deze middelen is bekend dat zij ook vaatpermeabiliteit kunnen beïnvloeden. Wij zullen drie middelen testen waarvan beschreven is dat zij (elders in het lichaam) vaatlekkage kunnen remmen.
2. *C1-esteraseremmer*, lichaamseigen eiwitten welke het complementsysteem remt en waarvan is aangetoond dat het beschermt tegen vaatlekkage en endotheelschade. Daarnaast beïnvloedt C1-esteraseremmer de stollingscascade.
3. *Statines*. Deze cholesterolsyntheseremmers verlagen niet alleen de plasmaspiegels van cholesterol, maar hebben ook een beschermend effect op het endotheel, o.a. door de preventie van oxidatieve stress en relatieve hyperglykemie (reperfusie). Globaal worden voornamelijk 3 soorten statines voorgeschreven, welke wij zullen testen.
4. *Aquaporines*, een groep lichaamseigen eiwitten welke zich in het membraan van endotheelcellen bevindt en van belang is bij de regeneratie van endotheelcellen. Aquaporines worden verminderd tot expressie wordt gebracht in ziek, atherosclerotisch endotheel. Van een aantal middelen welke ingrijpen op met name Aquaporine-1 en 4 is bekend dat zij vaatpermeabiliteit beïnvloeden. Wij zullen maximaal 3 van deze middelen onderzoeken.
5. *Angiopoiëtine-like proteïnes*. Deze uitscheidbare eiwitten spelen een rol bij de cholesterolhuishouding. Van deze middelen is in het brein aangetoond dat ze vaatlekkage en oedeem kunnen beschermen (na een periode van ischemie). Er zullen maximaal 3 angiopoiëtine-like proteïnes worden getest.
6. *CD40-signalering*. CD40 is een molecuul wat zich onder andere op endotheelcellen bevindt. en speelt een rol bij vaatpermeabiliteit. Het is reeds aangetoond in het brein dat remming van CD40-ligand (wat aan CD40 bindt en stimuleert) ischemie-reperfusieschade remt. Er zijn meerdere manieren om de CD40 signalering te remmen. Wij zullen hiervan maximaal 2 stoffen testen.
7. *Glucose-gehalte*. Het is bekend dat diabetici een toegenomen vaatpermeabiliteit hebben en dat hoge glucosespiegels de integriteit van endotheelcellen kunnen verminderen. In hoeverre dit een rol speelt rondom een hartinfarct is niet bekend. Er zullen maximaal 4 verschillende glucosege-

haltes worden getest.

De tweede categorie die we zullen onderzoeken behelst de antistollingsmiddelen. Naar mate vaatlekkage groter wordt, zullen rode bloedcellen buiten bloedbaan treden (IMH). Normaliter weerhoudt het stollingssysteem een massale uitreding van rode bloedcellen. Dit stollingssysteem wordt echter in de meeste hart- en vaatpatiënten medicamenteus geremd. Er zijn dus mogelijk ook externe factoren die het optreden van IMH beïnvloeden. Wij zullen de invloed van deze middelen op het optreden van IMH onderzoeken. Hierin is een onderscheid te maken tussen drie groepen antistollingsmiddelen, welke elk op een andere wijze ingrijpen op de stolling. De groepen die we zullen onderzoeken zijn:

1. *Trombineremmers*. Deze stoffen blokkeren trombine. Trombine activeert de bloedplaatjes (= trombocyten) waardoor het stollingsproces in gang wordt gezet. Maximaal 4 verschillende trombineremmers zullen worden getest.
2. *Trombocytenaggregatieremmers*. Deze stoffen remmen de trombocytenaggregatie en op deze manier de vorming en groei van stolsels. Maximaal 4 verschillende trombocytenaggregatieremmers zullen worden getest.
3. *Factor Xa-remmers*. Deze middelen remmen de activiteit van stollingsfactor Xa. Factor Xa leidt tot de vorming van trombine. Maximaal 4 verschillende Factor Xa-remmers zullen worden getest.

In beide categorieën zullen ook placebogroepen worden meegenomen. Per categorie zal voor elke groep middelen een placebogroep gebruikt worden (maximaal 10). Als primaire uitkomstparameters hanteren wij de mate van vasculaire permeabiliteit, welke wordt vastgesteld middels enkele vaatlekkagetracers en de mate van intramyocardiale hemorragie. Daarnaast zullen we de veranderingen in de morfologie van endotheelcellen bestuderen.

In alle groepen van het project zal gebruik worden gemaakt van het zelfde type dierproef, welke hieronder en in de bijlage Bijschrijving dierproeven (volgnummer 1) is beschreven.

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

In experimenten zal gebruik gemaakt worden van een cardiaal ischemie-reperfusiemodel met ratten. Hierbij wordt één van de kransslagaders tijdelijk volledig afgebonden, en daarna weer geopend om de humane situatie na te bootsen, waarin patiënten met een acuut hartinfarct worden gedotterd. Dit dient in-vivo te gebeuren, omdat de complexe samenhang tussen anatomie, hemodynamica en celmetabolisme niet goed buiten het lichaam is na te bootsen. Er wordt met ratten gewerkt, omdat ratten een cardiale anatomie hebben, die zeer vergelijkbaar is met de mens. Dit is een erkend model om hart- en vaatziekten te bestuderen en wordt vele in de literatuur gebruikt. [REDACTED]

Een overzicht van de hoofdlijnen is ook schematisch weergegeven in de Bijlage Figuren (Figuur 1).

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

Het no-reflow fenomeen wordt gekenmerkt door schade aan de capillairen, waarbij vaatlekkage optreedt en rode bloedcellen buiten de bloedbaan treden. In dit project kijken we in eerste instantie naar enkele interne factoren die van invloed zijn op het optreden van vaatlekkage. Tevens kijken we naar de rol van externe factoren (antistollingsmiddelen) op het optreden van IMH. Er is geen bepaalde volgorde in de uitvoering van de experimenten.

Voor een schematisch overzicht van de verschillende onderdelen zie de Bijlage Figuren (Figuur 2).

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

Volgnummer	Type dierproef
------------	----------------

1	Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

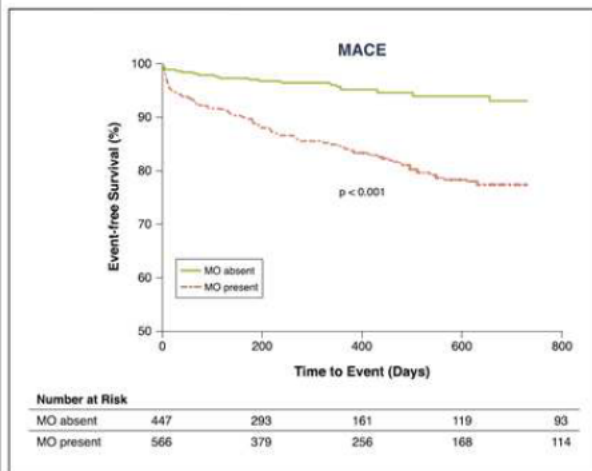
3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Vandaag de dag zijn hart- en vaatziekten nog steeds doodsoorzaak nummer 1 wereldwijd en naar verwachting zal het aantal patiënten met kransslaglijden in de toekomst nog verder toenemen. De meest heftige manifestatie hiervan is het acuut myocardinfarct, waarvoor revascularisatie middels primaire percutane coronaire interventie (PCI; dotterbehandeling) de gouden standaard is. De PCI heeft de mortaliteit van een hartinfarct teruggebracht naar minder dan 5%. Echter, in 40-50% van de patiënten welke voor een acuut myocardinfarct worden behandeld middels PCI blijft –ondanks succesvolle revascularisatie– een deel van het vaatbed suboptimaal geperfundeed. Dit betreft voornamelijk de capillairen en wordt *No-Reflow* genoemd. No-reflow kan het beste zichtbaar worden gemaakt met MRI en is gerelateerd met een verminderde myocardiale perfusie. Daarnaast gaat de aanwezigheid van no-reflow gepaard met een verhoogde morbiditeit en mortaliteit (figuur 1).



Figuur 1. Aanwezigheid van no-reflow, hier microvasculaire obstructie (MO) genoemd, gaat gepaard met significante toename in Major Adverse Cardiac Events (MACE), ten opzichte van de afwezigheid van MO.

Bron: Van Kranenburg et al, JACCci, 2014

Helaas heeft uitgebreid onderzoek nog niet aangetoond wat de exacte oorzaken zijn voor no-reflow en is er nog geen adequate therapie beschikbaar. Aanvankelijk werd gedacht dat tijdens de PCI kleine bloedstolsels (microthrombi) los raakten en stroomafwaarts vastliepen in de capillairen en een verstopping veroorzaakten (microëmbolisatie). Echter hebben verschillende mogelijke therapieën hiertegen, zoals (extra) bloedverdunders en thrombosuctie in patiënten geen voordeel laten zien. Naast microëmbolisatie zijn er nog een aantal mechanismes voorgedragen, welke no-reflow kunnen verklaren. Voorbeelden hiervan zijn vochtophoping (oedeem) en de influx van immuuncellen, maar solide bewijs hiervoor ontbreekt.

echter aangetoond dat ter plaatse van no-reflow, de microvasculatuur ernstig beschadigd is. In het centrum van het no-reflowgebied bleken de endotheelcellen zelfs volledig verdwenen te zijn. Daarbij waren rode bloedcellen massaal buiten de bloedbaan getreden. Dit laatste wordt ook wel intramyocardiale

hemorragie of IMH genoemd. Het optreden van IMH staat in contrast met de eerdere hypothese dat bloedpropjes verantwoordelijk zijn voor het no-reflow fenomeen en zet vraagtekens bij het huidige gebruik van bloedverdunders rondom een dotterprocedure.

Dit betekent dat er na het openen van het afgesloten bloedvat, therapeutische ruimte bestaat om schade aan de microvasculatuur te beperken. omdat hier in de cardiovasculaire wetenschap geruime ervaring mee is, ratten voldoende groot zijn om een van de coronairen chirurgisch af te binden en relatief lage kosten met zich mee brengen. Daarnaast komt de anatomie van het hart in grote mate overeen met dat van de mens. Zodoende zijn de resultaten goed vertaalbaar naar de humane situatie.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Onderzoeksdoel:

Dit onderzoeksproject richt zich op het optreden van IMH en heeft als hoofddoel te onderzoeken welke

mechanismen verantwoordelijk zijn voor endotheelschade en in hoeverre enkele veel voorgeschreven medicijnen (o.a. bloedverduuners) van invloed zijn op het optreden van IMH. Om dit te onderzoeken zijn een aantal onderzoeksvragen/subdoelen opgesteld.

- 1) Wat is het effect van endotheelmodulerende middelen op het optreden van vaatlekkage en intramyocardiale hemorragie in een cardiaal ischemie-reperfusiemodel.
- 2) Wat is het effect van externe factoren (medicatie) op het optreden van vaatlekkage en intramyocardiale hemorragie in een cardiaal ischemie-reperfusie model.

Haalbaarheid:

Daarnaast zal bij de uitvoering van de experimenten en de hier opvolgende analyses nauw worden samengewerkt met de afdelingen . Hierdoor kunnen verschillende expertises worden gecombineerd voor een optimaal resultaat. Het gebruikte hartinfarctmodel met ratten is veel beschreven in de literatuur voor onderzoek naar hart- en vaatziekten, waardoor resultaten goed vergelijkbaar zijn. Vanuit een praktisch oogpunt wordt de haalbaarheid vergroot doordat alle benodigde apparatuur aanwezig en biedt het lokale universitair proefdiercentrum alle benodigde faciliteiten voor een succesvolle uitvoering.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang

Voordat er een adequate behandeling tegen IMH ontwikkeld kan worden, is het van groot belang dat eerst de basismechanismen wordt doorgrond, welke verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van IMH. Hiervoor is gedegen kennis nodig van de verschillende processen die spelen in het hart rondom een dotterbehandeling.

Maatschappelijk belang

Nederland telt 1 miljoen hart- en vaat patiënten en jaarlijks krijgen er 30.000 mensen een hartinfarct in ons land. Dat zijn ongeveer 80 mensen per dag. Het merendeel van deze patiënten zal een dotterbehandeling ondergaan, en daarbij mogelijk IMH ontwikkelen. Indien IMH voorkomen of genezen kan worden, is dit van groot maatschappelijk belang.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Diermodel

Om de ontstaanswijze van IMH te onderzoeken zullen wij gebruik maken van een ischemie-reperfusiemodel. De humane situatie, waarbij IMH enkel wordt gezien na een myocardinfarct (ischemie), met aansluitende een succesvolle revascularisatie (reperfusie) wordt goed nagebootst door dit diermodel.

Daarnaast zullen wij aan het eind van het experiment de rattenharten ex-vivo perfunderen en laten functioneren in een Langendorff opstelling. Dit stelt ons in staat om in een controleerde omgeving vaatlekkage en hartfunctie te kwantificeren.

Ischemie- en reperfusieduur

In de humane situatie is een ischemieduur van ≤ 60 minuten relatief kort, waarbij de meeste myocardiale schade in de eerste 2-3 uur van ischemie wordt veroorzaakt . In ratten is de duur waarbij maximale myocardiale schade optreedt echter korter; de meeste schade treedt al op in de eerste 60 minuten van ischemie, waarna een plateau fase wordt bereikt .

In dit model passen wij daarom een maximale ischemieduur toe van 60 minuten.

Dit houden we ook aan in het huidige voorstel.

Diergroepen

In dit project bestuderen we twee categorieën middelen, welke allebei mogelijk van invloed zijn op het optreden van vaatlekkage en intramyocardiale hemorragie. Deze twee categorieën kunnen elk worden onderverdeeld in meerdere groepen middelen. Elke groep grijpt (binnen de desbetreffende categorie) op een andere manier aan op vaatpermeabiliteit en/of IMH. Door deze groepen met elkaar te vergelijken, wordt inzicht verkregen in de ontstaanswijze van vaatlekkage en IMH. Daarnaast is het binnen een aantal van deze groepen mogelijk meerdere soorten middelen te onderscheiden, welke elk net op een andere wijze werken. We zullen dus ook binnen de groepen kijken naar welke soort middel het meest gunstig effect heeft. Dit geeft niet alleen extra informatie over de pathofysiologie, maar helpt ook een keuze te maken in eventuele vervolgstudies.

Hieronder staat de twee categorieën, met de hieronder vallende groepen en soorten middelen beschreven. Daarbij is per groep aangegeven hoeveel soorten middelen er maximaal onderzoeken zullen worden. Een schematisch overzicht is tevens in figuur 2 in de Bijlage Figuren weergegeven.

In de eerste categorie richten we ons op de microcirculatie, omdat deze het meest kwetsbaar is en als eerste is aangedaan bij een myocardinfarct. De microcirculatie bestaat vrijwel volledig uit een enkele laag endotheelcellen, welke de barrière vormt tussen de bloedbaan en de hartspier. Wanneer het endotheel beschadigd raakt, zal de barrièrefunctie afnemen, waardoor er IMH kan optreden. Om te onderzoeken welke interne factoren precies bijdragen aan het optreden van IMH, zullen we in een reeks experimenten ingrijpen op verschillende factoren waarvan bekend is dat zij een rol spelen bij endotheelfunctie en/of vaatpermeabiliteit. De middelen die wij hiervoor zullen gebruiken zijn onderverdeeld in groepen, welke hieronder staan opgenoemd. Gezien het feit dat onze focus primair ligt op de interne factoren die IMH veroorzaken, zijn in deze categorie meer groepen opgenomen dan in de tweede categorie.

1. *Proteïnekinasereimmers*. Proteïnekinasereimmers zijn er in vele vormen en kennen een tal van indicaties, waaronder de behandeling van kanker. Van een aantal van deze middelen is bekend dat zij ook vaatpermeabiliteit kunnen beïnvloeden. Wij zullen drie middelen testen waarvan beschreven is dat zij (elders in het lichaam) vaatlekkage kunnen remmen.
2. *C1-esteraseremmer*, lichaamseigen eiwitten welke het complementsysteem remt en waarvan is aangetoond dat het beschermt tegen vaatlekkage en endotheelschade. Daarnaast beïnvloedt C1-esteraseremmer de stollingscascade.
3. *Statines*. Deze cholesterol-synthesereimmers verlagen niet alleen de plasmaspiegels van cholesterol, maar hebben ook een beschermend effect op het endotheel, o.a. door de preventie van oxidatieve stress en relatieve hyperglykemie (reperfusie). Globaal worden voornamelijk 3 soorten statines voorgeschreven, welke wij zullen testen.
4. *Aquaporines*, een groep lichaamseigen eiwitten welke zich in het membraan van endotheelcellen bevindt en van belang is bij de regeneratie van endotheelcellen. Aquaporines worden verminderd tot expressie wordt gebracht in ziek, atherosclerotisch endotheel. Van een aantal middelen welke ingrijpen op met name Aquaporine-1 en 4 is bekend dat zij vaatpermeabiliteit beïnvloeden. Wij zullen maximaal 3 van deze middelen onderzoeken.
5. *Angiopoiëtiëne-like proteïnes*. Deze uitscheidbare eiwitten spelen een rol bij de cholesterol-huishouding. Van deze middelen is in het brein aangetoond dat ze vaatlekkage en oedeem kunnen beschermen (na een periode van ischemie). Er zullen maximaal 3 angiopoiëtiëne-like proteïnes worden getest.
6. *CD40-signalering*. CD40 is een molecuul wat zich onder andere op endotheelcellen bevindt. en speelt een rol bij vaatpermeabiliteit. Het is reeds aangetoond in het brein dat remming van CD40-ligand (wat aan CD40 bindt en stimuleert) ischemie-reperfusieschade remt. Er zijn meerdere manieren om de CD40 signalering te remmen. Wij zullen hiervan maximaal 2 stoffen testen.
7. *Glucose-gehalte*. Het is bekend dat diabetici een toegenomen vaatpermeabiliteit hebben en dat hoge glucosespiegels de integriteit van endotheelcellen kunnen verminderen. In hoeverre dit een rol speelt rondom een hartinfarct is niet bekend. Er zullen maximaal 4 verschillende glucosege-

haltes worden getest.

De tweede categorie die we zullen onderzoeken behelst de antistollingsmiddelen. Naar mate vaatlekkage groter wordt, zullen rode bloedcellen buiten bloedbaan treden (IMH). Normaliter weerhoudt het stollingssysteem een massale uitreding van rode bloedcellen. Dit stollingssysteem wordt echter in de meeste hart- en vaatpatiënten medicamenteus geremd. Er zijn dus mogelijk ook externe factoren die het optreden van IMH beïnvloeden. Wij zullen de invloed van deze middelen op het optreden van IMH onderzoeken. Hierin is een onderscheid te maken tussen drie groepen antistollingsmiddelen, welke elk op een andere wijze ingrijpen op de stolling. De groepen die we zullen onderzoeken zijn:

1. *Trombineremmers*. Deze stoffen blokkeren trombine. Trombine activeert de bloedplaatjes (= trombocyten) waardoor het stollingsproces in gang wordt gezet. Maximaal 4 verschillende trombineremmers zullen worden getest.
2. *Trombocytenaggregatieremmers*. Deze stoffen remmen de trombocytenaggregatie en op deze manier de vorming en groei van stolsels. Maximaal 4 verschillende trombocytenaggregatieremmers zullen worden getest.
3. *Factor Xa-remmers*. Deze middelen remmen de activiteit van stollingsfactor Xa. Factor Xa leidt tot de vorming van trombine. Maximaal 4 verschillende Factor Xa-remmers zullen worden getest.

In beide categorieën zullen ook placebogroepen worden meegenomen. Per categorie zal voor elke groep middelen een placebogroep gebruikt worden (maximaal 10). Als primaire uitkomstparameters hanteren wij de mate van vasculaire permeabiliteit, welke wordt vastgesteld middels enkele vaatlekkagetracers en de mate van intramyocardiale hemorragie. Daarnaast zullen we de veranderingen in de morfologie van endotheelcellen bestuderen.

In alle groepen van het project zal gebruik worden gemaakt van het zelfde type dierproef, welke hieronder en in de bijlage Bijschrijving dierproeven (volgnummer 1) is beschreven.

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

In experimenten zal gebruik gemaakt worden van een cardiaal ischemie-reperfusiemodel met ratten. Hierbij wordt één van de kransslagaders tijdelijk volledig afgebonden, en daarna weer geopend om de humane situatie na te bootsen, waarin patiënten met een acuut hartinfarct worden gedotterd. Dit dient in-vivo te gebeuren, omdat de complexe samenhang tussen anatomie, hemodynamica en celmetabolisme niet goed buiten het lichaam is na te bootsen. Er wordt met ratten gewerkt, omdat ratten een cardiale anatomie hebben, die zeer vergelijkbaar is met de mens. Dit is een erkend model om hart- en vaatziekten te bestuderen en wordt vele in de literatuur gebruikt. [REDACTED]

Een overzicht van de hoofdlijnen is ook schematisch weergegeven in de Bijlage Figuren (Figuur 1).

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

Het no-reflow fenomeen wordt gekenmerkt door schade aan de capillairen, waarbij vaatlekkage optreedt en rode bloedcellen buiten de bloedbaan treden. In dit project kijken we in eerste instantie naar enkele interne factoren die van invloed zijn op het optreden van vaatlekkage. Tevens kijken we naar de rol van externe factoren (antistollingsmiddelen) op het optreden van IMH. Er is geen bepaalde volgorde in de uitvoering van de experimenten.

Voor een schematisch overzicht van de verschillende onderdelen zie de Bijlage Figuren (Figuur 2). **Om te voorkomen dat dieren onnodig worden gebruikt voor proeven, waarbij van te voren mag worden aangenomen dat een middel niet werkzaam is, wordt gebruik gemaakt van een beslisboom (zie Bijlage Figuren, Figuur 3).**

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Medisch Centrum				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 30%;">Volgnummer</td> <td>Type dierproef</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">1</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten</td> </tr> </table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten
Volgnummer	Type dierproef					
1	Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimentele aanpak:

Om vaatlekkage en het uittreden van rode bloedcellen na een acuut myocard infarct (intramyocardiale hemorrhagie of IMH) te besturen is het gebruik van een diermodel noodzakelijk. We kiezen ervoor om in alle groepen het zelfde type dierproef te gebruiken: een cardiaal ischemie-reperfusiemodel in ratten. Ratten hebben een hart dat qua anatomie zeer vergelijkbaar is met de mens. Ze zijn daarnaast geschikt om relatief gemakkelijk een operatieve ingreep op uit te voeren [REDACTED]. Daarnaast biedt dit model de mogelijkheid het weefsel middels (electronen)microscopie tot in detail te bestuderen.

[REDACTED] is gebleken dat in dit diermodel de inductie van ischemie-reperfusie een duidelijk effect in de primaire uitkomstparameters naar voren brengt (zie hieronder), ten opzichte van controle. Welke mechanisme hier exact aan ten grondslag liggen is echter nog niet duidelijk. Om dit te onderzoeken zullen we [REDACTED] onderzoeken wat de invloed is van enkele interne en externe factoren, ten opzichte van placebo. Dit zullen we doen middels het toedienen van specifieke middelen, waarvan bekend dat zij een rol spelen bij vaatpermeabiliteit en/of bloedstolling en dus mogelijk ook van invloed zijn op de primaire uitkomstparameters (zie hieronder). Door het effect van deze middelen te bestuderen kan meer inzicht worden gekregen in welke mechanisme verantwoordelijk zijn voor het optreden van IMH.

De middelen die bestudeerd zullen worden, staan hieronder opgesomd. De motivatie voor de keus voor deze middelen staat beschreven in het Projectvoorstel dierproeven, paragraaf 3.2 Onderzoeksstrategie.

1. Proteïnekinaseremmers.
2. C1-esteraseremmer.
3. Statines.
4. Aquaporines.
5. Angiopoietin-like proteïnes
6. Glucose.
7. CD40-signalering.
8. Trombineremmers.
9. Trombocytenaggregatieremmers.
10. Factor Xa-remmers.

Uitkomstparameters:

Om het effect van bovenstaande middelen te bestuderen kijken we naar de volgende uitkomstparameters. De primaire uitkomstparameters richten zich op vaatlekkage en zijn: de mate van uittreding van erythrocyten in het hart en de mate van uitreding van kunstmatige vaatlekkage-tracers, zoals bijvoorbeeld microsferen en/of gelabeld albumine. Deze tracers hebben onder andere als voordeel dat de grootte ervan te controleren is, om zodoende onderscheid te kunnen maken tussen vroege en late vaatlekkage. Zowel erythrocyten en de tracers kunnen post-mortem uitstekend worden gekwantificeerd middels microscopie.

De secundaire uitkomstparameters richten zich op de veranderingen van het weefsel zelf en zijn: de morfologische veranderingen van capillaire endotheelcellen in het hart, de mate van celdood en hartfunctie. De morfologische veranderingen en celdood zullen middels microscopie worden vastgesteld; voor de hartfunctie zal echografie worden gebruikt.

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

Nadat de proefdieren op het proefdiercentrum zijn aangekomen zullen zij minimaal 14 dagen acclimatiseren. Gedurende deze periode worden de dieren in groepshuisvesting gehouden en krijgen een standaard dieet. De dieren zullen dagelijks worden geïnspecteerd en regelmatig worden gewogen door ervaren diervverzorgers/biotechnici.

Na deze periode zullen de dieren worden geanestheesd middels gasanesthesie met aanvullende pijnstilling. Hierna worden de dieren geïntubeerd en deels geschoren. Via de intubatie zullen de dieren adequaat worden geventileerd met daarbij een aanvullende onderhoudsdosering gasanesthesie. Daarna zal de borstkas chirurgisch worden geopend en gespreid, zodat het hart en de linker kransslagader (LAD) zichtbaar worden. Deze LAD zal vervolgens met een verwijderbare ligatie tijdelijk volledig worden afgebonden. Na de periode van afsluiting (ischemie), zal de ligatie worden opgeheven, waardoor de bloedtoevoer wordt hersteld (reperfusie).

Gedurende deze periode van ischemie en/of reperfusie zal middels een injectie een van de hierboven beschreven middelen en een tracer voor vroege vaatlekkage worden toegediend. Deze tracer is biologisch inert en treedt enkel bij toegenomen vaatpermeabiliteit buiten de bloedbaan. Tevens zal gedurende deze periode echografie worden toegepast om de hartfunctie te bestuderen.

Na een vaste periode van reperfusie, zal het hart worden uitgenomen en direct in ijskoude buffer worden gedompeld, om de contractie te stoppen en weefschade tegen te gaan. Door het uitnemen van het hart, zal het dier overlijden. Het uitgenomen hart zal vervolgens aan een Langendorff-opstelling worden gekoppeld. In deze opstelling wordt het hart zodanig geperfundeed, dat het zijn contractiele functie –buiten het lichaam– herstelt en behoudt. De Langendorff opstelling biedt daarmee de mogelijkheid om onder gecontroleerde omstandigheden hartfunctie, perfusie en vaatweerstand te meten. Tevens wordt een tweede tracer voor toegediend om gevorderde vaatlekkage te kunnen kwantificeren. Hierna zal het hart worden gefixeerd en gepreserveerd voor histologische analyse (microscopie).

Een overzicht van de beoogde behandeling is ook schematisch weergegeven in de Bijlage Figuren (Figuur 1).

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

Van elke hart zal het weefsel aan achterzijde –waarvan geen toevoerende kransslagader is afgebonden– worden gebruikt om te vergelijken met het gebied van de hartspier waar ischemie-reperfusie is geïnduceerd. Op deze manier kan een deel van de analyses gepaard worden getest. Dit verhoogt het onderscheidend vermogen van de proef en daarmee wordt het aantal benodigde dieren geminimaliseerd. Dit is niet echter niet mogelijk voor alle parameters (zoals hartfunctie), waardoor de noodzaak voor placebogroepen blijft bestaan. We hebben de groepsgrootte berekend middels een poweranalyse, gebaseerd op waardes uit eerdere experimenten waarbij we uitgaan van het volgende: power 0.8, alfa 0.05, verschil in gemiddelde 0.15, standaard deviatie 0.15. Het verwachte uitvalspercentage is 10%, voornamelijk door niet-corrigeerbare ritmestoornissen, waaraan de dieren zullen sterven. Gezien de volledige anesthesie zal dit het welzijn/ongerief niet aantasten. Dit leidt tot een groepsgrootte van 19 dieren per onderdeel. Het verwachte uitvalspercentage en overige uitgangswaardes zijn gebaseerd op [REDACTED] [REDACTED]

B. De dieren

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

Er wordt gebruik gemaakt van mannelijke Wistar ratten. In vakliteratuur wordt beschreven vrouwelijke ratten minder ischemie-reperfusieschade ondervinden, voornamelijk door de cardioprotectieve werking van oestrogenen [REDACTED]

[REDACTED] Dit maakt vrouwelijk dieren minder geschikt om het effect van de beschreven middelen te testen. Toekomstig onderzoek zal moeten uitwijzen of er tussen mannen en vrouwen systematische verschillen zijn in het optreden van IMH; dit ligt echter buiten de scope van dit onderzoeksproject. De dieren worden afgenomen van een erkende leverancier. De dieren zullen rond de 10 weken oud zijn aan het begin het experiment. Er zullen in totaal 760 dieren gebruikt worden (19 dieren per groep, 31 interventiegroepen en 1 placebogroep). Een overzicht van alle groepen met bijhorende aantallen zijn schematisch weergegeven in de Bijlage Figuren (Figuur 2).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging

Hart- en vaatziekten zijn in oorsprong zeer complex en dit geldt met name voor de reeks aan kort opeenvolgende veranderingen die optreden rondom een acuut hartinfarct. Hierbij spelen niet alleen weefselkarakteristieken een rol, maar ook specifieke veranderingen in bloeddruk en –stroomsnelheid, alsmede de instroom van bloedplaatjes en immuuncellen. Voor het bestuderen van capillairen zijn microscopische analyses nodig, waarbij een stukje weefsel onontbeerlijk is. Bij patiënten zou dit een biopsie betekenen, wat in het geval van hartweefsel niet goed mogelijk en risicovol is. Daarom zijn er proefdieren nodig om dit onderzoek uit te voeren.

Vermindering

Gebaseerd op resultaten uit eerdere proeven hebben wij een inschatting gemaakt van het te verwachten effect. Middels een powerberekening kan dan worden uitgerekend wat het kleinste aantal dieren is, dat nodig is om een statistisch significant verschil aan te tonen. Daarnaast zullen de dieren deels als eigen controle worden gebruikt, waardoor het aantal benodigde dieren verder wordt teruggebracht.

Verfijning

Alle experimenten worden onder anesthesie met aanvullende pijnstilling uitgevoerd en alle dieren worden onder anesthesie met aanvullende pijnstilling gedood.

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

Na een periode van acclimatisatie worden de dieren in groepshuisvesting geplaatst, met ad libitum toegang tot voer en water. Tijdens de operatie krijgen de dieren anesthesie met aanvullende pijnbestrijding, waardoor het ongerief licht is. Tevens is operatieduur zo kort als mogelijk gehouden voor het doel van dit experiment. De dieren zullen niet ontwaken uit de anesthesie, wat het ongerief tevens licht houdt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Zover onze kennis reikt zijn dergelijk proeven nog niet eerder uitgevoerd of is hier de data nog niet van gepresenteerd. [REDACTED] is op de hoogte van wat er in het onderzoeksveld speelt. Het risico op duplicatie is klein.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke

wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Er zal gasanesthesie met aanvullende pijnstilling worden gebruikt. Pijnstilling wordt regelmatig getest door de reactie op een pijnstimulus te controleren.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Niet van toepassing.

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

Niet van toepassing.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

Het experiment wordt gestopt indien er meer dan 25% van de dieren uitvalt door sterfte tijdens de operatie. Gezien de volledige anesthesie zal dit het welzijn/ongerief niet aantasten.

K. Classificatie van ongerief

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

Dit zijn allemaal terminale experimenten. Alle dieren worden onder anesthesie met aanvullende pijnstilling gedood.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om de effecten van de interventie op het hart goed te kunnen bestuderen, dient het hart uit het lichaam te worden genomen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Medisch Centrum	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimentele aanpak:

Om vaatlekkage en het uittreden van rode bloedcellen na een acuut myocard infarct (intramyocardiale hemorrhagie of IMH) te besturen is het gebruik van een diermodel noodzakelijk. We kiezen ervoor om in alle groepen het zelfde type dierproef te gebruiken: een cardiaal ischemie-reperfusiemodel in ratten. Ratten hebben een hart dat qua anatomie zeer vergelijkbaar is met de mens. Ze zijn daarnaast geschikt om relatief gemakkelijk een operatieve ingreep op uit te voeren en er is [REDACTED]. Daarnaast biedt dit model de mogelijkheid het weefsel middels (electronen)microscopie tot in detail te bestuderen.

[REDACTED] is gebleken dat in dit diermodel de inductie van ischemie-reperfusie een duidelijk effect in de primaire uitkomstparameters naar voren brengt (zie hieronder), ten opzichte van controle. Welke mechanisme hier exact aan ten grondslag liggen is echter nog niet duidelijk. Om dit te onderzoeken zullen we [REDACTED] onderzoeken wat de invloed is van enkele interne en externe factoren, ten opzichte van placebo. Dit zullen we doen middels het toedienen van specifieke middelen, waarvan bekend dat zij een rol spelen bij vaatpermeabiliteit en/of bloedstolling en dus mogelijk ook van invloed zijn op de primaire uitkomstparameters (zie hieronder). Door het effect van deze middelen te bestuderen kan meer inzicht worden gekregen in welke mechanisme verantwoordelijk zijn voor het optreden van IMH.

De middelen die bestudeerd zullen worden, staan hieronder opgesomd. De motivatie voor de keus voor deze middelen staat beschreven in het Projectvoorstel dierproeven, paragraaf 3.2 Onderzoeksstrategie.

1. Proteïnekinaseremmers.
2. C1-esteraseremmer.
3. Statines.
4. Aquaporines.
5. Angiopoietin-like proteïnes
6. Glucose.
7. CD40-signalering.
8. Trombineremmers.
9. Trombocytenaggregatieremmers.
10. Factor Xa-remmers.

Uitkomstparameters:

Om het effect van bovenstaande middelen te bestuderen kijken we naar de volgende uitkomstparameters. De primaire uitkomstparameters richten zich op vaatlekkage en zijn: de mate van uittreding van erythrocyten in het hart en de mate van uitreding van kunstmatige vaatlekkage-tracers, zoals bijvoorbeeld microsferen en/of gelabeld albumine. Deze tracers hebben onder andere als voordeel dat de grootte ervan te controleren is, om zodoende onderscheid te kunnen maken tussen vroege en late vaatlekkage. Zowel erythrocyten en de tracers kunnen post-mortem uitstekend worden gekwantificeerd middels microscopie.

De secundaire uitkomstparameters richten zich op de veranderingen van het weefsel zelf en zijn: de morfologische veranderingen van capillaire endotheelcellen in het hart, de mate van celdood en hartfunctie. De morfologische veranderingen en celdood zullen middels microscopie worden vastgesteld; voor de hartfunctie zal echografie worden gebruikt.

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

Nadat de proefdieren op het proefdiercentrum zijn aangekomen zullen zij minimaal 14 dagen acclimatiseren. Gedurende deze periode worden de dieren in groepshuisvesting gehouden en krijgen een standaard dieet. De dieren zullen dagelijks worden geïnspecteerd en regelmatig worden gewogen door ervaren diervverzorgers/biotechnici.

Na deze periode zullen de dieren worden geanestheseerd middels gasanesthesie met aanvullende pijnstilling. Hierna worden de dieren geïntubeerd en deels geschoren. Via de intubatie zullen de dieren adequaat worden geventileerd met daarbij een aanvullende onderhoudsdosering gasanesthesie. Daarna zal de borstkast chirurgisch worden geopend en gespreid, zodat het hart en de linker kransslagader (LAD) zichtbaar worden. Deze LAD zal vervolgens met een verwijderbare ligatie tijdelijk volledig worden afgebonden. Na de periode van afsluiting (ischemie), zal de ligatie worden opgeheven, waardoor de bloedtoevoer wordt hersteld (reperfusie).

Gedurende deze periode van ischemie en/of reperfusie zal middels een injectie een van de hierboven beschreven middelen en een tracer voor vroege vaatlekkage worden toegediend. Deze tracer is biologisch inert en treedt enkel bij toegenomen vaatpermeabiliteit buiten de bloedbaan. Tevens zal gedurende deze periode echografie worden toegepast om de hartfunctie te bestuderen.

Na een vaste periode van reperfusie, zal het hart worden uitgenomen en direct in ijsskoude buffer worden gedompeld, om de contractie te stoppen en weefschade tegen te gaan. Door het uitnemen van het hart, zal het dier overlijden. Het uitgenomen hart zal vervolgens aan een Langendorff-opstelling worden gekoppeld. In deze opstelling wordt het hart zodanig geperfundeed, dat het zijn contractiele functie –buiten het lichaam– herstelt en behoudt. De Langendorff opstelling biedt daarmee de mogelijkheid om onder gecontroleerde omstandigheden hartfunctie, perfusie en vaatweerstand te meten. Tevens wordt een tweede tracer voor toegediend om gevorderde vaatlekkage te kunnen kwantificeren. Hierna zal het hart worden gefixeerd en gepreserveerd voor histologische analyse (microscopie).

Een overzicht van de beoogde behandeling is ook schematisch weergegeven in de Bijlage Figuren (Figuur 1).

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

Van elke hart zal het weefsel aan achterzijde –waarvan geen toevoerende kransslagader is afgebonden– worden gebruikt om te vergelijken met het gebied van de hartspier waar ischemie-reperfusie is geïnduceerd. Op deze manier kan een deel van de analyses gepaard worden getest. Dit verhoogt het onderscheidend vermogen van de proef en daarmee wordt het aantal benodigde dieren **verder** geminimaliseerd. Dit is niet echter niet mogelijk voor alle parameters (zoals hartfunctie), waardoor de noodzaak voor placebogroepen blijft bestaan.

Voor de berekening van de groepsgrootte gaan we uit van de volgende gegevens: power 0.8, alfa 0.05, verschil in gemiddelde 0.15, standaard deviatie 0.15. Het verwachte uitvalspercentage in **dit relatief kort ischemie-reperfusiemodel** is 10%. Dit wordt voornamelijk veroorzaakt door niet-corrigeerbare ritmestoornissen, waaraan de dieren **voortijdig** zullen sterven. **Deze ritmestoornissen zijn het gevolg van de ischemie/reperfusie, maar kunnen worden verminderd door het gebruik van gasanesthesie, wat wij zullen toepassen in deze dierproef.** Gezien de volledige anesthesie zullen eventuele ritmestoornissen het welzijn/ongerief niet aantasten. **Een powerberekening op basis van bovenstaande gegevens** leidt dit tot een groepsgrootte van 19 dieren per onderdeel. Het verwachte uitvalspercentage en overige uitgangswaardes zijn gebaseerd op [REDACTED].

B. De dieren

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

Er wordt gebruik gemaakt van mannelijke Wistar ratten. In vakliteratuur wordt beschreven vrouwelijke ratten minder ischemie-reperfusieschade ondervinden, voornamelijk door de cardioprotectieve werking van oestrogenen [REDACTED].

[REDACTED] Dit maakt vrouwelijk dieren minder geschikt om het effect van de beschreven middelen te testen. Toekomstig onderzoek zal moeten uitwijzen of er tussen mannen en vrouwen systematische verschillen zijn in het optreden van IMH; dit ligt echter buiten de scope van dit onderzoeksproject. De dieren worden afgenomen van een erkende leverancier. De dieren zullen rond de 10 weken oud zijn aan het begin het experiment. Er zullen in totaal 760 dieren gebruikt worden (19 dieren per groep, 31 interventiegroepen en 1 placebogroep). Een overzicht van alle groepen met bijhorende aantallen zijn schematisch weergegeven in de Bijlage Figuren (Figuur 2).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging

Hart- en vaatziekten zijn in oorsprong zeer complex en dit geldt met name voor de reeks aan kort opeenvolgende veranderingen die optreden rondom een acuut hartinfarct. Hierbij spelen niet alleen weefselkarakteristieken een rol, maar ook specifieke veranderingen in bloeddruk en –stroomsnelheid, alsmede de instroom van bloedplaatjes en immuuncellen. Voor het bestuderen van capillairen zijn microscopische analyses nodig, waarbij een stukje weefsel onontbeerlijk is. Bij patiënten zou dit een biopsie betekenen, wat in het geval van hartweefsel niet goed mogelijk en risicovol is. Daarom zijn er proefdieren nodig om dit onderzoek uit te voeren.

Vermindering

Gebaseerd op resultaten uit eerdere proeven hebben wij een inschatting gemaakt van het te verwachten effect. Middels een powerberekening kan dan worden uitgerekend wat het kleinste aantal dieren is, dat no-

dig is om een statistisch significant verschil aan te tonen. Daarnaast zullen de dieren deels als eigen controle worden gebruikt, waardoor het aantal benodigde dieren verder wordt teruggebracht.

Verfijning

Alle experimenten worden onder anesthesie met aanvullende pijnstilling uitgevoerd en alle dieren worden onder anesthesie met aanvullende pijnstilling gedood.

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

Na een periode van acclimatisatie worden de dieren in groepshuisvesting geplaatst, met ad libitum toegang tot voer en water. Tijdens de operatie krijgen de dieren anesthesie met aanvullende pijnbestrijding, waardoor het ongerief licht is. Tevens is operatieduur zo kort als mogelijk gehouden voor het doel van dit experiment. De dieren zullen niet ontwaken uit de anesthesie, wat het ongerief tevens licht houdt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Zover onze kennis reikt zijn dergelijk proeven nog niet eerder uitgevoerd of is hier de data nog niet van gepresenteerd. [REDACTED] is op de hoogte van wat er in het onderzoeksveld speelt. Het risico op duplicatie is klein.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Er zal gasanesthesie met aanvullende pijnstilling worden gebruikt. Pijnstilling wordt regelmatig getest door de reactie op een pijnstimulus te controleren.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Niet van toepassing.

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

Niet van toepassing.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

Het experiment wordt gestopt indien er meer dan 25% van de dieren uitvalt door sterfte **wegens ernstige ritmestoornissen** tijdens de operatie. Gezien de volledige anesthesie zal dit het welzijn/ongerief niet aantasten.

K. Classificatie van ongerief

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

Dit zijn allemaal terminale experimenten. Alle dieren worden onder anesthesie met aanvullende pijnstilling gedood.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om de effecten van de interventie op het hart goed te kunnen bestuderen, dient het hart uit het lichaam te worden genomen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Medisch Centrum				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten
Volgnummer	Type dierproef				
1	Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorrhagie bij ischemie-reperfusie in ratten				

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimentele aanpak:

Om vaatlekkage en het uittreden van rode bloedcellen na een acuut myocard infarct (intramyocardiale hemorrhagie of IMH) te besturen is het gebruik van een diermodel noodzakelijk. We kiezen ervoor om in alle groepen het zelfde type dierproef te gebruiken: een cardiaal ischemie-reperfusiemodel in ratten. Ratten hebben een hart dat qua anatomie zeer vergelijkbaar is met de mens. Ze zijn daarnaast geschikt om relatief gemakkelijk een operatieve ingreep op uit te voeren en er is [REDACTED].
[REDACTED] Daarnaast biedt dit model de mogelijkheid het weefsel middels (electronen)microscopie tot in detail te bestuderen.

Uit [REDACTED] is gebleken dat in dit diermodel de inductie van ischemie-reperfusie een duidelijk effect in de primaire uitkomstparameters naar voren brengt (zie hieronder), ten opzichte van controle. Welke mechanisme hier exact aan ten grondslag liggen is echter nog niet duidelijk. Om dit te onderzoeken zullen we met [REDACTED] onderzoeken wat de invloed is van enkele interne en externe factoren, ten opzichte van placebo. Dit zullen we doen middels het toedienen van specifieke middelen, waarvan bekend dat zij een rol spelen bij vaatpermeabiliteit en/of bloedstolling en dus mogelijk ook van invloed zijn op de primaire uitkomstparameters (zie hieronder). Door het effect van deze middelen te bestuderen kan meer inzicht worden gekregen in welke mechanisme verantwoordelijk zijn voor het optreden van IMH.

De middelen die bestudeerd zullen worden, staan hieronder opgesomd. De motivatie voor de keus voor deze middelen staat beschreven in het Projectvoorstel dierproeven, paragraaf 3.2 Onderzoeksstrategie.

1. Proteïnekinaseremmers.
2. C1-esteraseremmer.
3. Statines.
4. Aquaporines.
5. Angiopoietin-like proteïnes
6. Glucose.
7. CD40-signalering.
8. Trombineremmers.
9. Trombocytenaggregatieremmers.
10. Factor Xa-remmers.

Uitkomstparameters:

Om het effect van bovenstaande middelen te bestuderen kijken we naar de volgende uitkomstparameters. De primaire uitkomstparameters richten zich op vaatlekkage en zijn: de mate van uittreding van erythrocyten in het hart en de mate van uitreding van kunstmatige vaatlekkage-tracers, zoals bijvoorbeeld microsferen en/of gelabeld albumine. Deze tracers hebben onder andere als voordeel dat de grootte ervan te controleren is, om zodoende onderscheid te kunnen maken tussen vroege en late vaatlekkage. Zowel erythrocyten en de tracers kunnen post-mortem uitstekend worden gekwantificeerd middels microscopie.

De secundaire uitkomstparameters richten zich op de veranderingen van het weefsel zelf en zijn: de morfologische veranderingen van capillaire endotheelcellen in het hart, de mate van celdood en hartfunctie. De morfologische veranderingen en celdood zullen middels microscopie worden vastgesteld; voor de hartfunctie zal echografie worden gebruikt.

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

Nadat de proefdieren op het proefdiercentrum zijn aangekomen zullen zij minimaal 14 dagen acclimatiseren. Gedurende deze periode worden de dieren in groepshuisvesting gehouden en krijgen een standaard dieet. De dieren zullen dagelijks worden geïnspecteerd en regelmatig worden gewogen door ervaren diervverzorgers/biotechnici.

Na deze periode zullen de dieren worden geanestheseerd middels gasanesthesie met aanvullende pijnstilling. Hierna worden de dieren geïntubeerd en deels geschoren. Via de intubatie zullen de dieren adequaat worden geventileerd met daarbij een aanvullende onderhoudsdosering gasanesthesie. Daarna zal de borstkast chirurgisch worden geopend en gespreid, zodat het hart en de linker kransslagader (LAD) zichtbaar worden. Deze LAD zal vervolgens met een verwijderbare ligatie tijdelijk volledig worden afgebonden. Na de periode van afsluiting (ischemie), zal de ligatie worden opgeheven, waardoor de bloedtoevoer wordt hersteld (reperfusie).

Gedurende deze periode van ischemie en/of reperfusie zal middels een injectie een van de hierboven beschreven middelen en een tracer voor vroege vaatlekkage worden toegediend. Deze tracer is biologisch inert en treedt enkel bij toegenomen vaatpermeabiliteit buiten de bloedbaan. Tevens zal gedurende deze periode echografie worden toegepast om de hartfunctie te bestuderen.

Na een vaste periode van reperfusie, zal het hart worden uitgenomen en direct in ijsskoude buffer worden gedompeld, om de contractie te stoppen en weefsel schade tegen te gaan. Door het uitnemen van het hart, zal het dier overlijden. Het uitgenomen hart zal vervolgens aan een Langendorff-opstelling worden gekoppeld. In deze opstelling wordt het hart zodanig geperfundeed, dat het zijn contractiele functie –buiten het lichaam– herstelt en behoudt. De Langendorff opstelling biedt daarmee de mogelijkheid om onder gecontroleerde omstandigheden hartfunctie, perfusie en vaatweerstand te meten. Tevens wordt een tweede tracer voor toegediend om gevorderde vaatlekkage te kunnen kwantificeren. Hierna zal het hart worden gefixeerd en gepreserveerd voor histologische analyse (microscopie).

Een overzicht van de beoogde behandeling is ook schematisch weergegeven in de Bijlage Figuren (Figuur 1).

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

Van elke hart zal het weefsel aan achterzijde –waarvan geen toevoerende kransslagader is afgebonden– worden gebruikt om te vergelijken met het gebied van de hartspier waar ischemie-reperfusie is geïnduceerd. Op deze manier kan een deel van de analyses gepaard worden getest. Dit verhoogt het onderscheidend vermogen van de proef en daarmee wordt het aantal benodigde dieren verder geminimaliseerd. Dit is niet echter niet mogelijk voor alle parameters (zoals hartfunctie), waardoor de noodzaak voor placebogroepen blijft bestaan.

Voor de berekening van de groepsgrootte gaan we uit van de volgende gegevens: power 0.8, alfa 0.05, verschil in gemiddelde 0.15, standaard deviatie 0.15. Het verwachte uitvalspercentage in dit relatief kort ischemie-reperfusiemodel is 10%. Dit wordt voornamelijk veroorzaakt door niet-corrigeerbare ritmestoornissen, waaraan de dieren voortijdig zullen sterven. Deze ritmestoornissen zijn het gevolg van de ischemie/reperfusie, maar kunnen worden verminderd door het gebruik van gasanesthesie, wat wij zullen toepassen in deze dierproef. Gezien de volledige anesthesie zullen eventuele ritmestoornissen het welzijn/ongerief niet aantasten. Een powerberekening op basis van bovenstaande gegevens leidt dit tot een groepsgrootte van 19 dieren per onderdeel. Het verwachte uitvalspercentage en overige uitgangswaardes zijn gebaseerd op [REDACTED].

B. De dieren

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

Er wordt gebruik gemaakt van mannelijke Wistar ratten. In vakliteratuur wordt beschreven vrouwelijke ratten minder ischemie-reperfusieschade ondervinden, voornamelijk door de cardioprotectieve werking van oestrogenen [REDACTED]. Dit maakt vrouwelijk dieren minder geschikt om het effect van de beschreven middelen te testen. Toekomstig onderzoek zal moeten uitwijzen of er tussen mannen en vrouwen systematische verschillen zijn in het optreden van IMH; dit ligt echter buiten de scope van dit onderzoeksproject. De dieren worden afgenomen van een erkende leverancier. De dieren zullen rond de 10 weken oud zijn aan het begin het experiment. Er zullen in totaal 760 dieren gebruikt worden (19 dieren per groep, 31 interventiegroepen en 1 placebogroep). Een overzicht van alle groepen met bijhorende aantallen zijn schematisch weergegeven in de Bijlage Figuren (Figuur 2).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging

Hart- en vaatziekten zijn in oorsprong zeer complex en dit geldt met name voor de reeks aan kort opeenvolgende veranderingen die optreden rondom een acuut hartinfarct. Hierbij spelen niet alleen weefselkarakteristieken een rol, maar ook specifieke veranderingen in bloeddruk en –stroomsnelheid, alsmede de instroom van bloedplaatjes en immuuncellen. Voor het bestuderen van capillairen zijn microscopische analyses nodig, waarbij een stukje weefsel onontbeerlijk is. Bij patiënten zou dit een biopsie betekenen, wat in het geval van hartweefsel niet goed mogelijk en risicovol is. Daarom zijn er proefdieren nodig om dit onderzoek uit te voeren.

Vermindering

Gebaseerd op resultaten uit eerdere proeven hebben wij een inschatting gemaakt van het te verwachten effect. Middels een powerberekening kan dan worden uitgerekend wat het kleinste aantal dieren is, dat no-

dig is om een statistisch significant verschil aan te tonen. Daarnaast zullen de dieren deels als eigen controle worden gebruikt, waardoor het aantal benodigde dieren verder wordt teruggebracht. **Om te voorkomen dat dieren onnodig worden gebruikt voor proeven, waarbij van te voren mag worden aangenomen dat een middel niet werkzaam is, wordt gebruik gemaakt van een beslisboom (zie Bijlage Figuren, Figuur 3).**

Verfijning

Alle experimenten worden onder anesthesie met aanvullende pijnstilling uitgevoerd en alle dieren worden onder anesthesie met aanvullende pijnstilling gedood.

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

Na een periode van acclimatisatie worden de dieren in groepshuisvesting geplaatst, met ad libitum toegang tot voer en water. Tijdens de operatie krijgen de dieren anesthesie met aanvullende pijnbestrijding, waardoor het ongerief licht is. Tevens is operatieduur zo kort als mogelijk gehouden voor het doel van dit experiment. De dieren zullen niet ontwaken uit de anesthesie, wat het ongerief tevens licht houdt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Zover onze kennis reikt zijn dergelijk proeven nog niet eerder uitgevoerd of is hier de data nog niet van gepresenteerd. [REDACTED] is op de hoogte van wat er in het onderzoeksveld speelt. Het risico op duplicatie is klein.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Er zal gasanesthesie met aanvullende pijnstilling worden gebruikt. Pijnstilling wordt regelmatig getest door de reactie op een pijnstimulus te controleren.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Niet van toepassing.

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

Niet van toepassing.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

Het experiment wordt gestopt indien er meer dan 25% van de dieren uitvalt door sterfte **wegens ernstige ritmestoornissen** tijdens de operatie. Gezien de volledige anesthesie zal dit het welzijn/ongerief niet aantasten.

K. Classificatie van ongerief

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

Dit zijn allemaal terminale experimenten. Alle dieren worden onder anesthesie met aanvullende pijnstilling gedood.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om de effecten van de interventie op het hart goed te kunnen bestuderen, dient het hart uit het lichaam te worden genomen.

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

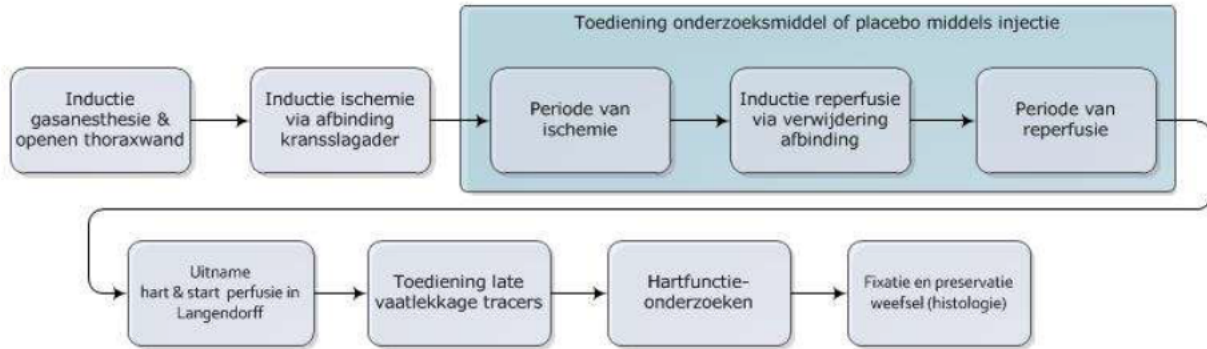
Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

Bijlage Figuren

Figuur 1. Overzicht van de onderzoekshandelingen.

Chronologische weergave van de verschillende handelingen welke per dier worden uitgevoerd.



Figuur 2. Overzicht van de verschillende groepen.

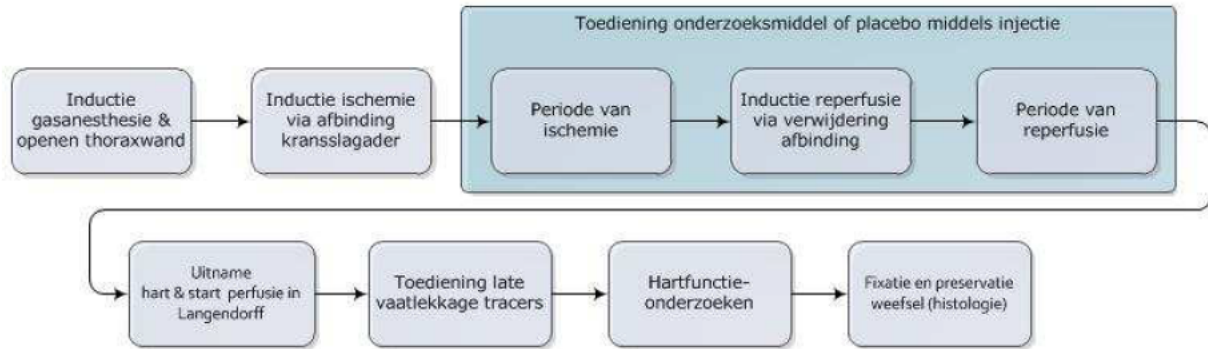
Schematische weergave van de twee categorieën met de bijhorende soorten middelen en groepen. Tussen de haakjes is per soort is het maximaal aantal groepen en aantal dieren vermeld. De volgorde waarin de soorten middelen zullen worden uitgevoerd kan afwijken van de volgorde zoals beschreven in de aanvraag.

Soorten middelen (maximaal aantal groepen en aantal dieren):		
1.	Proteïnekinaseremmers	(3 groepen + 1 placebo, n=76)
2.	C1-esteraseremmers	(1 groep + 1 placebo, n=38)
3.	Statines	(3 groepen + 1 placebo, n=76)
4.	Aquaporines	(3 groepen + 1 placebo, n=76)
5.	Angiopoietin-like proteïnes	(3 groepen + 1 placebo, n=76)
6.	Glucose-concentraties	(3 groepen + 1 placebo, n=76)
7.	CD-40 signalering	(2 groepen + 1 placebo, n=57)
Categorie 1 (interne factoren)		
8.	Trombineremmers	(4 groepen + 1 placebo, n=95)
9.	Trombocytenaggregatieremmers	(4 groepen + 1 placebo, n=95)
10.	Factor Xa-remmers	(4 groepen + 1 placebo, n=95)
Categorie 2 (externe factoren)		
Totaal aantal dieren (maximaal)		760 dieren

Bijlage Figuren

Figuur 1. Overzicht van de onderzoekshandelingen.

Chronologische weergave van de verschillende handelingen welke per dier worden uitgevoerd.



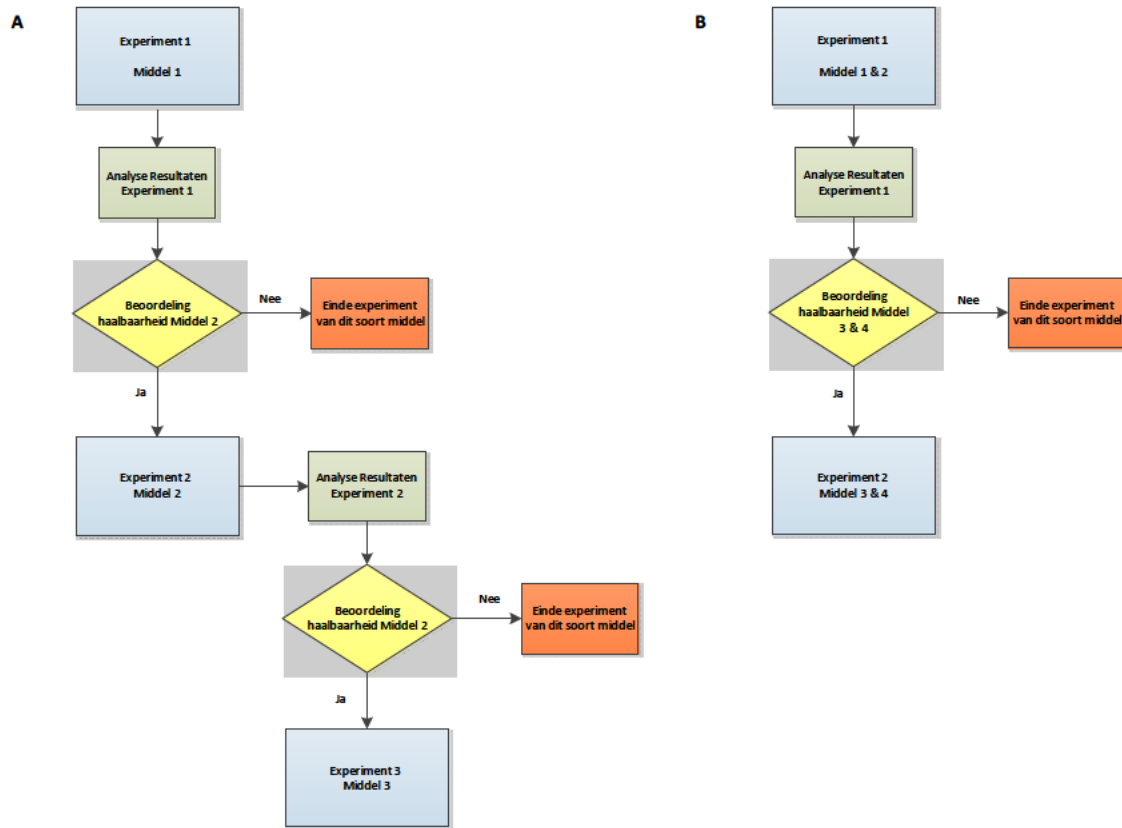
Figuur 2. Overzicht van de verschillende groepen

Schematische weergave van de twee categorieën met de bijhorende soorten middelen en groepen. Tussen de haakjes is per soort is het maximaal aantal groepen en aantal dieren vermeld. De volgorde waarin de soorten middelen zullen worden uitgevoerd kan afwijken van de volgorde zoals beschreven in de aanvraag.

Soorten middelen (maximaal aantal groepen en aantal dieren):		
1.	Proteïnekinaseremmers	(3 groepen + 1 placebo, n=76)
2.	C1-esteraseremmers	(1 groep + 1 placebo, n=38)
3.	Statines	(3 groepen + 1 placebo, n=76)
4.	Aquaporines	(3 groepen + 1 placebo, n=76)
5.	Angiopoietin-like proteïnes	(3 groepen + 1 placebo, n=76)
6.	Glucose-concentraties	(3 groepen + 1 placebo, n=76)
7.	CD-40 signalering	(2 groepen + 1 placebo, n=57)
Categorie 1 (interne factoren)		
8.	Trombineremmers	(4 groepen + 1 placebo, n=95)
9.	Trombocytenaggregatieremmers	(4 groepen + 1 placebo, n=95)
10.	Factor Xa-remmers	(4 groepen + 1 placebo, n=95)
Categorie 2 (externe factoren)		
Totaal aantal dieren (maximaal)		760 dieren



Figuur 3. Beslisboom voor de te toetsen soorten middelen . Per soort middel geldt een beslisboom. Weergegeven zijn de beslisbomen voor categorie 1 (A) en categorie 2 (B). In categorie 1 wordt eerst een enkel middel getoetst, waarna stapsgewijs zal worden bepaald wat de haalbaarheid is van de overige te toetsen middelen. In categorie 2 worden in het eerste experiment direct twee middelen met elkaar vergeleken.



Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
NVWA nummer 11400
2. Titel van het project:
Bestudering van de ontstaanswijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct.
3. Titel van de NTS:
Bestudering van de ontstaanswijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct.
4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: *18-07-2016*
 - aanvraag compleet: *18-07-2016*
 - in vergadering besproken: *13-09-2016*
 - anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - aanpassing aanvraag: *25-11-2016*
 - advies aan CCD: *12-12-2016*
7. Afstemming IvD
 - Datum advies IvD: *18-07-2016*
 - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *20-09-2016*
- Strekking gestelde vragen: *NTS moet tekstueel worden aangepast, de DEC ziet graag dat de translatie van de rat naar de mens duidelijker in het stuk naar voren komt, waarom wil men hier een ischemie-reperfusie model gebruiken? Men gaat ex-vivo experimenten doen, deze moet men bij 3.4.1 noemen. Bij 3.4.3 moet figuur 2 duidelijker worden weergegeven, daarbij moet men de go/no go momenten beter toelichten. Welke tijdstippen gaat men bekijken en waarom?*

- Datum antwoord: 26-09-2016
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

Vraagronde 2

- Datum: 20-10-2016
- Strekking gestelde vragen: *Het uitvalpercentage is niet helder, graag beter toelichten. Het aantal dieren komt niet overeen met de bijlage. Daarnaast nog enkele tekstuele aanpassingen.*
- Datum antwoord: 25-11-2016
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) : *n.v.t.*

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Is het project vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Eén van de DEC leden is betrokken bij dit project, dit lid was niet aanwezig tijdens de vergadering en is ook niet betrokken geweest bij de beoordeling van dit project.*

C. Beoordeling (inhoud)

1. *Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. *Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en toegepast onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. *Patiënten die voor een acuut hartinfarct behandeld worden met een dotterbehandeling krijgen vaak te maken met permanente schade aan het hart. In deze patiënten kan de doorbloeding van de kleine haarvaatjes van het hart deels verloren gaan, waardoor de aanvoer van zuurstof ernstig wordt beperkt (no-reflow) en waarbij rode bloedcellen buiten de bloedbaan treden en zich ophopen in de hartspier zelf (intramyocardiale hemorragie of IMH), wat gepaard gaat met een ziekte- en sterfte.*

Het directe doel van deze studie is de ontstaanswijze van IMH te doorgronden. Men gaat onderzoeken wat het effect is van endotheel-modulerende middelen (interne factoren) en antistollingsmiddelen (externe factoren zoals o.a. bloedverdunners) op het optreden van intramyocardiale hemorragie (IMH). Het uiteindelijke doel van de studie is om meer kennis te verkrijgen over de basismechanismen die verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van IMH. Deze nieuwe kennis is in de toekomst te gebruiken voor de ontwikkeling van een adequate behandeling tegen IMH.

Het betreft hier fundamenteel en toegepast onderzoek. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op de ontstaanswijze van IMH zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.

De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van een behandeling tegen IMH, welke IMH kan voorkomen of genezen. Hierdoor zal het welzijn van de patiënten en hun kwaliteit van leven verbeteren.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: *n.v.t.*

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn.

Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de

doelstelling binnen het kader van het project.

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen op termijn bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling voor IMH. De gevraagde looptijd van 3 jaar acht de DEC reëel, gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding. De dodingsmethode is volgens de bijlage IV richtlijn.

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

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd. Alle procedures worden uitgevoerd onder volledige verdoving en aan het eind komen de dieren niet meer bij bewustzijn, alle dieren in deze projectvergunningaanvraag ondergaan "terminaal" ongerief.

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren onder volledige anesthesie met aanvullende pijnstilling ingrepen ondergaan en aansluitend worden gedood.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. Het experiment wordt gestopt indien meer dan 25% van de dieren uitvalt door sterfte tijdens de operatie. Gezien de volledige anesthesie zal dit het welzijn/ongerief van de dieren niet aantasten.

3V's

14. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdier-vrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Voor deze studie op het gebied van IMH is een complex biologisch systeem, waarin interactie tussen cellen plaatsvindt, essentieel. Hart- en vaatziekten en de reeks opeenvolgende

veranderingen die optreden rondom een acuut hartinfarct zijn zeer complex. Hierbij spelen niet alleen de eigenschappen van het weefsel een rol, maar ook specifieke veranderingen in bloeddruk, stroomsnelheid en instroom van bloedplaatjes en afweercellen. Doordat al deze elementen van invloed zijn, kan het geheel niet goed worden nagebootst buiten het lichaam. Daarom zijn er proefdieren nodig om dit onderzoek uit te voeren.

De keuze voor het gebruik van ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Er is gekozen voor een hartinfarctmodel met ratten, omdat ratten een hart hebben dat goed vergelijkbaar is met dat van de mens. Het model wordt wereldwijd gebruikt en is veelvuldig beschreven in wetenschappelijke literatuur. [REDACTED]

15. *In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.*

Door gebruik te maken een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Daarnaast zullen de dieren deels als eigen controle worden gebruikt, waardoor het aantal benodigde dieren verder wordt teruggebracht. Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 760 ratten en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

16. *Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.*

Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. De operatieve ingreep zal onder narcose en met pijnbestrijding worden uitgevoerd. De dieren zullen aan het eind van de ingreep –terwijl zij nog onder narcose zijn– worden gedood, om het hart uit te kunnen nemen voor verdere analyse.

17. *Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt: n.v.t.*

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. *Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.*

Men zal gebruik maken van mannelijke ratten. In vakliteratuur wordt beschreven vrouwelijke ratten minder ischemie-reperfusieschade ondervinden, voornamelijk door de cardioprotectieve werking van oestrogenen [REDACTED]

[REDACTED] Dit maakt vrouwelijke dieren minder geschikt om het effect van de beschreven middelen te testen, daarom heeft men besloten alleen mannelijke dieren te gebruiken. De DEC onderschrijft deze keuze.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).

Het gaat hier om terminale experimenten, alle dieren worden onder volledige anesthesie (met aanvullende pijnstilling) gedood. Om de effecten van de interventie op het hart goed te kunnen bestuderen, dient het hart uit het lichaam te worden genomen.

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Dit is niet mogelijk omdat er post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

In deze dierproef is de centrale morele vraag:

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de basismechanismen voor het ontstaan van IMH en daarmee het beschikbaar komen van een behandeling voor patiënten met IMH het gebruik van 760 ratten in de dierproef die daarvan terminaal ongerief ondervinden?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en alle dieren ondervinden terminaal ongerief overeenkomstig met een lichte mate van ongerief. Dat leidt tijdens de dierproef tot gering nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: Veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten/maatschappij bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van een behandeling voor IMH.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 760 ratten die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Een groot deel van de patiënten die voor een acuut hartinfarct behandeld worden met een dotterbehandeling, heeft permanente schade aan het hart. In deze patiënten kan intramyocardiale hemorrhagie (IMH) optreden, wat zorgt voor ziekte en sterfte. Voor de ontwikkeling van een behandeling voor IMH is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is de ontstaanswijze van IMH te doorgronden. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling tegen IMH, is afgewogen tegen het, als terminaal geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 760 ratten en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het maatschappelijk en wetenschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de ontstaanswijze van IMH en zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling voor IMH.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 760 dieren en het daarbij verwachte terminale ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

De DEC heeft bij de beoordeling van dit project geen knelpunten/dilemma's geconstateerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD114002016774

Bijlagen

2

Datum 13 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 12 december 2016. Het gaat om uw project "Bestudering van de ontstaanwijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002016774. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

13 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD114002016774

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
13 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD114002016774

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 64156338
Straat en huisnummer: de Boelen 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
IBAN: [REDACTED]
Tenaamstelling van het rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
13 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD114002016774

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

Naam: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

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 januari 2017
Geplande einddatum: 1 januari 2020
Titel project: Bestudering van de ontstaanwijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct
Titel niet-technische samenvatting: Bestudering van de ontstaanwijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit/ VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED]
Amsterdam
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:
13 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD114002016774

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 468,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED)
Plaats: Amsterdam
Datum: 12 december 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD114002016774

Bijlagen

2

Datum 13 december 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 13 december 2016

Vervaldatum: 12 januari 2017

Factuurnummer: 16700774

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD114002016774	€ 468,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD114002016774

Datum 13 januari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 12 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bestudering van de ontstaanwijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct" met aanvraagnummer AVD114002016774. 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

U geeft bij het HEP aan dat bij uitval van 25% van de dieren of meer het experiment wordt gestaakt. Los van het gegeven dat dit eerder een go- nogo moment zou moeten zijn, vragen wij ons af wat de reële verwachting is van het percentage dieren dat overlijdt, wat deze uitval veroorzaakt en hoe u het zo veel als mogelijk voorkomt in de proefopzet. Graag uw toelichting hierop. 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. Stuur 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.

Datum:

13 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD114002016774

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



Melding bijlagen

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

Naam instelling: Vrije Universiteit Medisch Centrum

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD114002016774

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?
Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

13 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD114002016774

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 17 januari 2017 15:13
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: T.a.v. [REDACTED]. RE: vragen over project AVD 114002016774
Bijlagen: Melding bijlagen CCD AVD114002016774.pdf; 3.1 Beschrijving dierproef volgnummer 1 CCD M.Hollander ischemia-reperfusion CCDv2.docx; Toelichtingsbrief.docx

Beste [REDACTED]

Namens [REDACTED] stuur ik u hierbij onze toelichting op de door u gestelde vragen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Bijlagen:
-Melding bijlagen
-Beschrijving dierproef volgnummer 1
-Toelichtingsbrief

[REDACTED]

[REDACTED]
VU University Medical Centre
Adress: De Boelelaan 1117, 1081 HV, Amsterdam, the Netherlands

[REDACTED]

[REDACTED]

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: vrijdag 13 januari 2017 14:05
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: vragen over project AVD 114002016774

Geachte [REDACTED]
Aangaande uw projectaanvraag met als nummer AVD114002016774 hebben wij nog een vraag. Deze hebben wij gesteld middels bijgesloten brief.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

[REDACTED]

[REDACTED]

Gelieve email over projectaanvragen te richten aan: info@zbo-ccd.nl



Melding bijlagen

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

Naam instelling: Vrije Universiteit Medisch Centrum

Adres: De Boelelaan 1117
.....

Postcode en plaats: 1081HV Amsterdam
.....

Aanvraagnummer: AVD114002016774

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?
Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting
- Melding Machtiging
- Aanvraagformulier
- Brief toelichting
-
-

Datum:

13 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD114002016774

3 Ondertekening

Naam: XXXXXXXXXX

Datum: ..16.. - ..01.. - ..2017..

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Amsterdam, 17 januari 2017

Betreft: aanvraag projectvergunning AVD114002016774

Geachte leden van de CCD,

Naar aanleiding van uw brief van 13 januari jl., zouden we graag toelichting willen geven op de door u genoemde onduidelijkheden. Voor de overzichtelijkheid hebben we uw vragen opgesplitst en apart beantwoord.

Vraag 1: Wat is de reële verwachting van het percentage dieren dat overlijdt?

Op basis van [REDACTED], [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED] verwachten wij dat ongeveer 10% van de dieren vroegtijdig overlijdt. In andere studies, waarbij een dergelijk ischemie-reperfusie model wordt gebruikt, worden soms hogere uitvalpercentages genoemd (20-40%). Dit betreft echter grotendeels uitval in een later stadium (enkele dagen postoperatief). Gezien het hier een relatief kort hartinfarctmodel betreft, waarbij de dieren aan het eind van de operatie worden gedood om weefsel uit te kunnen nemen, verwachten wij een lager uitvalpercentage (10%).

Vraag 2. Wat veroorzaakt deze uitval?

De dieren overlijden vrijwel uitsluitend door ventriculaire ritmestoornissen gedurende operatie. Deze ritmestoornissen zijn duidelijk zichtbaar op het ECG [REDACTED]
[REDACTED] waargenomen. Indien de ritmestoornissen in ernst toenemen, zal de hartfunctie uiteindelijk dusdanig verslechteren, dat het dier hieraan overlijdt. Deze ritmestoornissen worden ook beschreven in de literatuur [REDACTED]

Vraag 3: Hoe voorkomt deze uitval zo veel als mogelijk in de proefopzet?

Door gebruik te maken van gasanesthesie proberen we het optreden van ernstige ritmestoornissen te beperken. Het is bekend dat isofluraan een beschermend effect heeft op het hart en ernstige ritmestoornissen als gevolg van ischemie-reperfusie beperkt [REDACTED]. Sevofluraan heeft een dergelijk, zo niet sterker, aritmogeen effect [REDACTED] maar beperkt daarnaast ook de schade die optreedt ten gevolge van ischemie-reperfusie [REDACTED]. Gezien deze schade het primair eindpunt van de studie is, hebben we er voor gekozen geen sevofluraan te gebruiken, omdat dit de effectgrootte vermindert. Hierdoor zouden er meer dieren nodig zijn, om een effect van de behandeling aan te tonen. Daarnaast gebruiken wij bij voorkeur ratten van [REDACTED] omdat hiervan bekend is dat zij minder snel overlijden aan een acuut myocardinfarct, dan soortgelijke ratten van andere leveranciers, zoals [REDACTED].

We hebben bovenstaande motivatie ingevoegd in de Bijschrijving Dierproeven volgnummer 1 (paragraaf A en J), welke u in de bijlagen kunt vinden. De wijzigingen zijn in het rood weergegeven.

Wij hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd en zien uw verdere beoordeling graag tegemoet. Mochten er toch nog vragen zijn, dan horen wij dat graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

VU Medisch Centrum

De Boelelaan 1117

1081 HV Amsterdam,

[REDACTED]

[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD114002016774

Datum 30 januari 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 12 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bestudering van de ontstaanwijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct" met aanvraagnummer AVD114002016774. 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

Onder dankzegging van de antwoorden op onze vorige brief is bij de bespreking nog een vraag naar boven gekomen.

De CCD vraagt zich af of u een beslisboom kunt toevoegen voor de stoffen die u van plan bent te gaan toetsen. Achterliggende gedachte daarbij is of door middel van het tijdig signaleren welke groepen stoffen niet werkzaam zijn u het gebruik van proefdieren kunt beperken.

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.

Datum:

30 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD114002016774

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).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



Melding bijlagen

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

Naam instelling: Vrije Universiteit Medisch Centrum

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD114002016774

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

30 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD114002016774

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Van: [redacted]
Verzonden: vrijdag 10 februari 2017 16:20
Aan: 'Info-zbo'
CC: [redacted]
Onderwerp: RE: T.a.v. [redacted]. RE: vragen over project AVD 114002016774
Bijlagen: Toelichtingsbrief.docx; 2. Projectvoorstel dierproeven CCD M.Hollander ischemia-reperfusion CCDv3.docx; 3.1 Beschrijving dierproef volgnummer 1 CCD M.Hollander ischemia-reperfusion CCDv3.docx; 5. Bijlage figuren CCDv3.docx

Geachte [redacted],
 Namens prof. van Royen stuur ik u de door de CCD gevraagde aanvullende informatie. Wij hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd en zien uw verdere beoordeling graag tegemoet. Mochten er toch nog vragen zijn, dan horen wij dat graag.
 Met vriendelijke groet,

[redacted]
Bijlagen:
 -Toelichtingsbrief
 -Projectvoorstel
 -Beschrijving dierproef volgnummer 1
 -Bijlage Figuren

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: vrijdag 10 februari 2017 14:00
Aan: [redacted]
CC: [redacted]
Onderwerp: RE: T.a.v. [redacted]. RE: vragen over project AVD 114002016774

Geachte [redacted],
 Volgens mijn administratie staat deze vraag nog open.
 Kunt u het antwoord zo snel als mogelijk sturen zodat het dossier afgehandeld kan worden?
 Met vriendelijke groet,

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 30 januari 2017 9:43
Aan: [redacted]
CC: [redacted]
Onderwerp: RE: T.a.v. [redacted]. RE: vragen over project AVD 114002016774

Geachte [redacted],
 Dank voor de heldere toelichting. De aanvraag is afgelopen vrijdag besproken waarbij nog een vraag naar voren kwam.
 Deze heb ik in de bijlage met een nieuwe brief verwoord.
 Zodra hierop een antwoord is ontvangen kan de CCD een beslissing nemen.
 Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
 Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag
 Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

[redacted]
Gelieve email over projectaanvragen te richten aan: info@zbo-ccd.nl

Van: [redacted]
Verzonden: dinsdag 17 januari 2017 15:13
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
CC: [redacted]
Onderwerp: T.a.v. [redacted] RE: vragen over project AVD 114002016774

Beste [redacted],
 Namens [redacted] stuur ik u hierbij onze toelichting op de door u gestelde vragen.
 Met vriendelijke groet,

[redacted]
Bijlagen:
 -Melding bijlagen
 -Beschrijving dierproef volgnummer 1
 -Toelichtingsbrief

[REDACTED]
[REDACTED]
VU University Medical Centre
Adress: De Boelelaan 1117, 1081 HV, Amsterdam, the Netherlands

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

Verzonden: vrijdag 13 januari 2017 14:05

Aan: [REDACTED]

Onderwerp: vragen over project AVD 114002016774

Geachte [REDACTED],

Aangaande uw projectaanvraag met als nummer AVD114002016774 hebben wij nog een vraag. Deze hebben wij gesteld middels bijgesloten brief.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

[REDACTED]
Email: [REDACTED]

Gelieve email over projectaanvragen te richten aan: info@zbo-ccd.nl

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Amsterdam, 10 februari 2017

Betreft: aanvraag projectvergunning AVD114002016774

Geachte leden van de CCD,

Naar aanleiding van uw brief van 30 januari jl., zouden we graag toelichting willen geven op de door u genoemde onduidelijkheden.

De CCD vraagt zich af of u een beslisboom kunt toevoegen voor de stoffen die u van plan bent te gaan toetsen. Achterliggende gedachte daarbij is of door middel van het tijdig signaleren welke groepen stoffen niet werkzaam zijn u het gebruik van proefdieren kunt beperken.

Wij zijn het eens met de CCD dat het gebruik van proefdieren voor een toetsing van middelen, waarvan een beoogde werkzaamheid niet kan worden verwacht niet juist is. Een beslisboom, zoals de CCD voorstelt, kan hierbij zinvol zijn en hebben wij daarom opgenomen in de nieuwe versie van de aanvraag. Deze kunt u vinden in de bijlage figuren (figuur 3) en is tevens vermeld in het Projectvoorstel (paragraaf 3.4.3) en in de Beschrijving Dierproeven volgnummer 1 (paragraaf D); wijzigingen zijn in rode tekst weergegeven.

Wij hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd en zien uw verdere beoordeling graag tegemoet. Mochten er toch nog vragen zijn, dan horen wij dat graag.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

[Redacted name]

VU Medisch Centrum
De Boelelaan 1117
1081 HV Amsterdam,

[Redacted address]





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD114002016774
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 12 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bestudering van de ontstaanwijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct" met aanvraagnummer AVD114002016774. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 10-02-2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft een beslisschema toegevoegd voor het testen van kandidaatstoffen.

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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Bestudering van de ontstaanwijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 februari 2017 tot en met 1 januari 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit/ VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 12 december 2016. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over,

inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002016774

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.

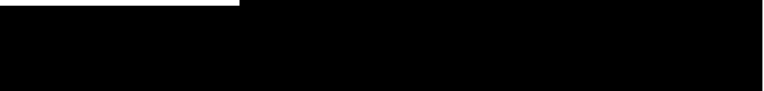
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel 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 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: Vrije Universiteit Medisch Centrum
Adres: de Boelen 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 februari 2017 tot en met 1 januari 2020, voor het project "Bestudering van de ontstaanwijze van bloedingen in het hart na een behandeld hartinfarct" met aanvraagnummer AVD114002016774, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit/ VU Medisch Centrum.

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

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 12 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 december 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 12 december 2016, ontvangen op 12 december 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 10-02-2017;

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Bestudering van het optreden van intramyocardiale hemorragie bij ischemie-reperfusie in ratten				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / niet gespecificeerd	760	100% Terminal	

Voorwaarden

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

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

Aanvraagnummer:

AVD114002016774

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:
AVD114002016774

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD114002016774

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.

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
nr.	document NTS 2016782	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel			x						
4	Bijlage animal procedure 1			x						
5	Bijlage animal procedure 2			x						
6	Bijlage animal procedure 3			x						
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
8	Mail verzoek om aanvulling				x		x	x		
9	Mail verzoek om aanvulling DEC				x		x	x		
10	DEC advies				x		x	x		
11	Advies CCD		x							x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x		



20 DEC. 2016

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10700 / 782
		<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	Maastricht university
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	50169181
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	Minderbroedersberg 4-6
		Postbus	616
		Postcode en plaats	6200MD Maastricht
		IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht
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	[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 - 2017
- Einddatum 1 - 2 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor de behandeling van boezemfibrilleren
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-UM
- Postadres Postbus 616, 6200MD Maastricht
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondertekende 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 Maastricht 

Datum 14 - 12 - 2016 

Handtekening 



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Atrial fibrillation (AF) is an arrhythmia characterized by fast (up to 600 beats per minute) and

irregular activations in the atria. In both AF patients and large animal models of AF, the arrhythmia is progressive in the sense that the duration of AF episodes gradually increases. The progressive, self-perpetuating nature of AF can be explained by the fact that AF causes changes in the atria that increase the stability of the arrhythmia. These changes include a shortening of the action potential duration and effective refractory period (electrical remodeling) and alterations in tissue structure (structural remodeling). The latter process includes altered connexin expression,¹ myocyte hypertrophy² and atrial fibrosis³. Whereas electrical remodeling takes place rapidly, within 1-2 days,^{4,5} structural remodeling progresses gradually over a time course of months^{6,7}. The stability of AF (measured as the duration of AF episodes or as the amenability to pharmacological cardioversion) increases over a comparable slow time course of months.^{8,9}

Using high-density epicardial contact mapping of AF, our group has shown that progression of structural remodeling and AF stability go hand in hand with an gradual increase in complexity of the AF conduction pattern, both in experimental and clinical studies.⁹⁻¹⁵ With the duration of the arrhythmia, the number of simultaneous fibrillation waves and the occurrence of conduction block increase, leading to a more dissociated pattern of fibrillatory conduction.^{9,11}

Our aim is to test the efficacy and safety of a number of novel drugs targeted at ion channels. The larger context of this work is a European network, the 'TrainNet' ITN, in which a number of electrophysiologists, pharmaceutical companies and computer modellers collaborate. A major advantage of this approach is that compounds are currently being tested in cultured cells and computer models. This will allow us to identify the most promising compounds without requiring animal experiments and thus greatly reduce the number of animal experiments. However, the lead compounds will still have to be tested in an animal model with hearts that resemble the human heart in size, electrophysiological properties and AF propagation pattern.

The ion channels targets that have been identified for this project are:

- the small conductance calcium-dependent potassium channel, I_{SK}
- the acetylcholine-activated potassium current $I_{K,ACh}$
- the late sodium current $I_{Na,late}$
- the inward rectifier current I_{K1}
- combined sodium current (I_{Na}) and potassium current (I_K) blockade

In the current project, these novel antiarrhythmic strategies will be assessed in the same animal model under equal conditions. This will allow their relative merits to be evaluated and compared directly.

The small conductance calcium-dependent potassium channel, I_{SK}

Small conductance Ca^{2+} -activated SK channels, underlying the I_{SK} current, are unique among ion channels due to their ability to sense changes in intracellular Ca^{2+} concentration and couple this to cellular electrical activity. Traditionally, these channels have been thought to be almost ubiquitously expressed with the exception of the heart. However, recently published reports indicate that SK channels are present in cardiac tissue and can have very important functions both under normal conditions and in pathophysiological settings.³⁹ Importantly, pharmacological blockage of I_{SK} has an effect on the human atrial AP in isolated human muscle bundles.⁴⁰ In rodent models of acutely induced AF, SK channel blockade can protect against AF.⁴¹ This altogether makes SK channels a very promising new target for treating AF.

As inhibition of SK channels can be obtained by different means (pore blocker versus allosteric modulator) an extensive pharmacological program is being executed within our network, and the lead compound from this approach will be tested in a goat model of AF.

In isolated perfused dog atria, I_{SK} blockade prolonged atrial repolarization, and thereby had a pro-arrhythmic effect.⁴² However, in anesthetized dogs with electrical remodeling (one week of rapid atrial pacing), an I_{SK} blocker has a strong antiarrhythmic effect.⁴³ The effect in conscious animals and in models with structural remodeling has not been investigated. The effect of I_{SK} blockade on the fibrillation pattern in electrically remodelled atria has also not been investigated.

The Acetylcholine-activated potassium current $I_{K,ACH}$

The acetylcholine-activated K^+ ($I_{K,ACH}$) current, conducted through $I_{K,ACH}$ channels, is primarily expressed in the atria and the sinus node. $I_{K,ACH}$ is activated following vagal activation, through G_i receptors, which in the nodal tissue contributes to slowing of pacemaking and in the atria shortens the action potential. In myocytes from AF patients and animal models of AF, a constitutively activated current component is found upregulated⁴⁴ which has been suggested to enhance the arrhythmicity of the atria.⁴⁵ The fact that AF can be triggered by vagal activation further supports the notion that $I_{K,ACH}$ plays a pivotal role in the initiation and perpetuation of the arrhythmia.⁴⁶ Pharmacological inhibition of $I_{K,ACH}$ in pre-clinical models has been suggested to constitute an atrial-selective target for safe and effective treatment of AF.⁴⁷

In a dog model of AF (electrical remodeling caused by 8 weeks of rapid atrial pacing with a controlled ventricular rate), two investigative $I_{K,ACH}$ blockers had a high efficacy for terminating AF.^{48, 49} The effects in conscious animals and in models with structural remodeling have not been investigated. The effect of $I_{K,ACH}$ blocker on fibrillation patterns are not known.

The inward rectifier current I_{K1}

In both AF patients and in large animal models of AF, the stability of AF increases with time, meaning that the duration of AF episodes gradually increases with time, and that restoration of sinus rhythm becomes more difficult to attain. One of the earliest changes in the atria during AF is a dramatic reduction in the duration of the action potential. Concomitantly, the atrial refractory period decreases, leading to an increase in the activation frequency during AF. This process of so-called 'electrical remodeling' is thought to be responsible for the early phase of AF stabilization.^{4, 50} Experimental studies have demonstrated that electrical remodeling is caused by changes in expression of various ion channels. The most important of these are the L-type calcium current (I_{CaL} , reduced by 70%), the transient outward potassium current (I_{to} , reduced by 70%) and the inward rectifier potassium current (I_{K1} , increased by 100%). In principle, all these changes can contribute to the decrease in action potential duration (APD). However, computer simulations show that the reduction in I_{CaL} and I_{to} only play a modest role, whereas the increase in I_{K1} has a major contribution to APD shortening.⁵¹ Therefore, it is to be expected that blockade of this current will cause a much larger prolongation of the APD and be a provide a more effective method to terminate AF. We will test this hypothesis by testing the antiarrhythmic properties of an I_{K1} blocker.⁵² The (poorly selective) I_{K1} blocker chloroquine terminated AF in perfused sheep hearts in which AF was induced with a high dose of acetylcholine⁵³ or by acute stretch⁵⁴. The effects in conscious animals, and models with electrical and structural remodeling have not been investigated.

The late sodium current $I_{Na,late}$

The sodium current (I_{Na}), which mediates the upstroke of the action potential in the working myocardium, normally inactivates quickly and completely. However, under pathological conditions, I_{Na} may not inactivate completely, producing a depolarizing current during the plateau and repolarization that prolongs the action potential and increases the likelihood of arrhythmogenic afterdepolarizations.⁵⁵ This persistent sodium current, $I_{Na,late}$ is also increased in AF patients.^{56, 57} Ranolazine, an older anti-anginal drug that also suppresses $I_{Na,late}$ has been effective against AF in

some animal models and perfused preparations.⁵⁵ However, ranolazine also blocks many other ion channels, complicating its use as an anti-arrhythmic drug.⁵⁸ Nevertheless, novel agents that block $I_{Na,late}$ more selectively remain a highly attractive strategy for the treatment of AF.⁵⁹ Therefore, we will test the efficacy of a selective blocker of the persistent sodium current in goat models of AF. The atrial effects of the selective $I_{Na,late}$ blocker GS-458967 have been investigated in perfused preparations.⁶⁰⁻⁶² The same blocker terminated AF in pig models of autonomically-triggered AF (combined administration of acetylcholine and epinephrine) under anesthesia⁶³ Eleclazine, another $I_{Na,late}$ blocker terminated AF in the same model⁶⁴ and in a pig model of ischemia-induced AF⁶⁵. The effects of selective $I_{Na,late}$ blockers in conscious animals and models with electrical and structural remodeling, and the impact on fibrillation pattern in these models, have not been investigated.

Combined I_{Na} and I_K blockade

Of the conventional antiarrhythmic drugs, both I_{Na} blockers (e.g. flecainide) and I_K blockers (e.g. dofetilide) have been proven effective in early stages of AF.^{8, 9, 66} The effects of both classes of drugs have been extensively characterized in animal models, including the goat model of AF. However, the efficacy of these drugs declines as structural remodeling progresses during later stages of the disease. Intriguingly, a recent publication using computer model of atrial tissue shows that a combination of I_{Na} and I_K blockers has a synergistic effect in terminating AF.⁶⁷ Although this is a promising concept, it has yet to be evaluated in a relevant animal model of AF. As such, combined I_{Na}/I_K blockade can be considered as a state-of-the-art standard of the efficacy that can be attained with current antiarrhythmic drugs. As such, it will be included in the current project as a comparison with the novel drug targets detailed above.

Regional differences in ion channel expression

The expression of ion channels and the shape of the action potential show regional variability within the atria.^{71,72} Most importantly, the expression level of several ion channels, and their relative change during electrical remodeling, is known to differ between the left and right atrium.^{29, 30} These differences in the electrophysiology and electrical remodeling lead to a gradient in activation frequency between the left and right atria, and therefore leads to differences in their contribution to the maintenance of AF.²⁹⁻³⁵ Previous studies have suggested the importance of the inter-atrial connections to AF maintenance,^{36, 37} and their altered behavior in AF patients³⁸. Furthermore, a recent study (unpublished own observations) revealed that those goats that were resistant to antiarrhythmic drugs had large electrophysiological differences between the right and left atrium. We believe that these gradients correspond to the relative contributions to the maintenance of AF. To obtain insight into the mechanism of cardioversion of novel antiarrhythmic drugs, we will determine the intrinsic contribution of left and right atrium by ablation of the inter-atrial connections (primarily Bachmann's bundle, the main right to left connection and the coronary sinus musculature) during sacrifice experiments.

1. Duffy HS, Wit AL. Is there a role for remodeled connexins in AF? No simple answers. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2008;44:4-13.
2. Spach MS, Heidlage JF, Barr RC, Dolber PC. Cell size and communication: role in structural and electrical development and remodeling of the heart.; Oct, 2004.
3. Spach M, Boineau J. Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol* 1997;20:397-413.
4. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Power J, Allessie MA. Electrical remodeling due to atrial fibrillation in chronically instrumented conscious goats: roles of neurohumoral changes, ischemia, atrial stretch, and high rate of electrical activation. *Circulation* 1997;96:3710-3720.
5. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;92:1954-1968.
6. Ausma J, Litjens N, Lenders MH, Duimel H, Mast F, Wouters L, Ramaekers F, Allessie M, Borgers M. Time course of atrial fibrillation-induced cellular structural remodeling in atria of the goat. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2001;33:2083-2094.
7. Ausma J, van der Velden H, Lenders M, van Ankeren E, Jongsma H, Ramaekers F, Borgers M, Allessie M. Reverse structural and gap-junctional remodeling after prolonged atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 2003;107:2051-2058 Epub 2003 Apr 2003 Apr 2007.
8. Eijsbouts S, Ausma J, Blaauw Y, Schotten U, Duytschaever M, Allessie M. Serial cardioversion by class IC Drugs during 4 months of persistent atrial fibrillation in the goat. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 2006;17:648-654.
9. Verheule S, Tuyls E, van Hunnik A, Kuiper M, Schotten U, Allessie M. Fibrillatory conduction in the atrial free walls of goats in persistent and permanent atrial fibrillation. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2010;3:590-599.
10. de Groot NMS, Houben RPM, Smeets JL, Boersma E, Schotten U, Schaliij MJ, Crijns H, Allessie MA. Electropathological substrate of longstanding persistent atrial fibrillation in patients with structural heart disease: epicardial breakthrough. *Circulation* 2010;122:1674-1682.
11. Allessie MA, de Groot NMS, Houben RPM, Schotten U, Boersma E, Smeets JL, Crijns HJ. Electropathological substrate of long-standing persistent atrial fibrillation in patients with structural heart disease: longitudinal dissociation. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2010;3:606-615.
12. Verheule S, Tuyls E, Gharaviri A, Hulsmans S, van Hunnik A, Kuiper M, Serroyen J, Zeemering S, Kuijpers NHL, Schotten U. Loss of Continuity in the Thin Epicardial Layer Due to Endomyocardial Fibrosis Increases the Complexity of Atrial Fibrillatory Conduction. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2013.

13. Eckstein J, Maesen B, Linz DK, Zeemering S, van Hunnik A, Verheule S, Allessie MA, Schotten U. Time course and mechanisms of endo-epicardial electrical dissociation during atrial fibrillation in the goat. *Cardiovascular research* 2011;89:816-824.
14. Eckstein J, Zeemering S, Linz D, Maesen B, Verheule S, van Hunnik A, Crijns H, Allessie MA, Schotten U. Transmural Conduction Is the Predominant Mechanism of Breakthrough During Atrial Fibrillation: Evidence From Simultaneous Endo-Epicardial High-Density Activation Mapping. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2013;6:334-341.
15. Maesen B, Zeemering S, Afonso C, et al. Rearrangement of atrial bundle architecture and consequent changes in anisotropy of conduction constitute the 3-dimensional substrate for atrial fibrillation. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2013;6:967-975.
16. Schoonderwoerd BA, Ausma J, Crijns HJ, Van Veldhuisen DJ, Blaauw EH, Van Gelder IC. Atrial ultrastructural changes during experimental atrial tachycardia depend on high ventricular rate. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004;15:1167-1174.
17. Anne W, Willems R, Holemans P, Beckers F, Roskams T, Lenaerts I, Ector H, Heidbuchel H. Self-terminating AF depends on electrical remodeling while persistent AF depends on additional structural changes in a rapid atrially paced sheep model. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:148-158.
18. Avitall B, Bi J, Mykitysey A, Chicos A. Atrial and ventricular fibrosis induced by atrial fibrillation: evidence to support early rhythm control. *Heart Rhythm* 2008;5:839-845.
19. Ehrlich JR, Nattel S, Hohnloser SH. Atrial fibrillation and congestive heart failure: specific considerations at the intersection of two common and important cardiac disease sets. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13:399-405.
20. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999;100:87-95.
21. Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, Nattel S. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 2000;101:2631-2638.
22. Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, Leung TK, Thorin E, Nattel S. Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: angiotensin-dependent and -independent pathways. *Cardiovasc Res* 2003;60:315-325.
23. Dispersyn GD, Ausma J, Thone F, Flameng W, Vanoverschelde JL, Allessie MA, Ramaekers FC, Borgers M. Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis. *Cardiovasc Res* 1999;43:947-957.
24. Thijssen VL, Ausma J, Borgers M. Structural remodelling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival. *Cardiovasc Res* 2001;52:14-24.
25. Everett THt, Wilson EE, Hulley GS, Olgin JE. Transmural characteristics of atrial fibrillation in canine models of structural and electrical atrial remodeling assessed by simultaneous epicardial and

endocardial mapping. *Heart Rhythm* 2010;7:506-517.

26. Li D, Benardeau A, Nattel S. Contrasting efficacy of dofetilide in differing experimental models of atrial fibrillation. *Circulation* 2000;102:104-112.

27. Guerra JM, Everett THt, Lee KW, Wilson E, Olgin JE. Effects of the gap junction modifier rotigaptide (ZP123) on atrial conduction and vulnerability to atrial fibrillation. *Circulation* 2006;114:110-118.

28. Everett THt, Wilson EE, Olgin JE. Effects of atrial fibrillation substrate and spatiotemporal organization on atrial defibrillation thresholds. *Heart Rhythm* 2007;4:1048-1056.

29. Sarmast F, Kolli A, Zaitsev A, Parisian K, Dhamoon AS, Guha PK, Warren M, Anumonwo JM, Taffet SM, Berenfeld O, Jalife J. Cholinergic atrial fibrillation: I(K,ACh) gradients determine unequal left/right atrial frequencies and rotor dynamics. *Cardiovasc Res* 2003;59:863-873.

30. Swartz MF, Fink GW, Lutz CJ, Taffet SM, Berenfeld O, Vikstrom KL, Kasproicz K, Bhatta L, Puskas F, Kalifa J, Jalife J. Left versus right atrial difference in dominant frequency, K(+) channel transcripts, and fibrosis in patients developing atrial fibrillation after cardiac surgery. *Heart Rhythm* 2009;6:1415-1422.

31. Berenfeld O, Mandapati R, Dixit S, Skanes AC, Chen J, Mansour M, Jalife J. Spatially distributed dominant excitation frequencies reveal hidden organization in atrial fibrillation in the Langendorff-perfused sheep heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;11:869-879.

32. Mansour M, Mandapati R, Berenfeld O, Chen J, Samie FH, Jalife J. Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2001;103:2631-2636.

33. Atenza F, Almendral J, Moreno J, et al. Activation of inward rectifier potassium channels accelerates atrial fibrillation in humans: evidence for a reentrant mechanism. *Circulation* 2006;114:2434-2442.

34. Atenza F, Almendral J, Jalife J, Zlochiver S, Ploutz-Snyder R, Torrecilla EG, Arenal A, Kalifa J, Fernandez-Aviles F, Berenfeld O. Real-time dominant frequency mapping and ablation of dominant frequency sites in atrial fibrillation with left-to-right frequency gradients predicts long-term maintenance of sinus rhythm. *Heart Rhythm* 2009;6:33-40.

35. Filgueiras-Rama D, Price NF, Martins RP, Yamazaki M, Avula UM, Kaur K, Kalifa J, Ennis SR, Hwang E, Devabhaktuni V, Jalife J, Berenfeld O. Long-term frequency gradients during persistent atrial fibrillation in sheep are associated with stable sources in the left atrium. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;5:1160-1167.

36. Kumagai K, Uno K, Khrestian C, Waldo AL. Single site radiofrequency catheter ablation of atrial fibrillation: studies guided by simultaneous multisite mapping in the canine sterile pericarditis model. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:917-923.

37. van Campenhout MJ, Yaksh A, Kik C, de Jaegere PP, Ho SY, Allessie MA, de Groot NM.

Bachmann's bundle: a key player in the development of atrial fibrillation? *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;6:1041-1046.

38. Teuwen CP, Yaksh A, Lanter EA, et al. Relevance of Conduction Disorders in Bachmann's Bundle During Sinus Rhythm in Humans. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2016;9:e003972.

39. Zhang XD, Lieu DK, Chiamvimonvat N. Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and cardiac arrhythmias. *Heart Rhythm* 2015;12:1845-1851.

40. Skibsbye L, Poulet C, Diness JG, Bentzen BH, Yuan L, Kappert U, Matschke K, Wettwer E, Ravens U, Grunnet M, Christ T, Jespersen T. Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria. *Cardiovasc Res* 2014;103:156-167.

41. Diness JG, Sorensen US, Nissen JD, Al-Shahib B, Jespersen T, Grunnet M, Hansen RS. Inhibition of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels terminates and protects against atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3:380-390.

42. Hsueh CH, Chang PC, Hsieh YC, Reher T, Chen PS, Lin SF. Proarrhythmic effect of blocking the small conductance calcium activated potassium channel in isolated canine left atrium. *Heart Rhythm* 2013;10:891-898.

43. Qi XY, Diness JG, Brundel BJ, Zhou XB, Naud P, Wu CT, Huang H, Harada M, Aflaki M, Dobrev D, Grunnet M, Nattel S. Role of small-conductance calcium-activated potassium channels in atrial electrophysiology and fibrillation in the dog. *Circulation* 2014;129:430-440.

44. Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U. The G protein-gated potassium current $I(K_{ACh})$ is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005;112:3697-3706.

45. Dobrev D, Wettwer E, Kortner A, Knaut M, Schuler S, Ravens U. Human inward rectifier potassium channels in chronic and postoperative atrial fibrillation. *Cardiovascular research* 2002;54:397-404.

46. Schuessler R, Grayson T, Bromberg B, Cox J, Boineau J. Cholinergically mediated tachyarrhythmias induced by a single extrastimulus in the isolated canine right atrium. *Circulation research* 1992;71:1254-1267.

47. Voigt N, Dobrev D. Atrial-Selective Potassium Channel Blockers. *Card Electrophysiol Clin* 2016;8:411-421.

48. Walfridsson H, Anfinson OG, Berggren A, Frison L, Jensen S, Linhardt G, Nordkam AC, Sundqvist M, Carlsson L. Is the acetylcholine-regulated inwardly rectifying potassium current a viable antiarrhythmic target? Translational discrepancies of AZD2927 and A7071 in dogs and humans. *Europace* 2015;17:473-482.

49. Yamamoto W, Hashimoto N, Matsuura J, et al. Effects of the selective K_{ACh} channel blocker NTC-801 on atrial fibrillation in a canine model of atrial tachypacing: comparison with class Ic and

III drugs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014;63:421-427.

50. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiological reviews* 2011;91:265-325.

51. Zhang H, Garratt CJ, Zhu J, Holden AV. Role of up-regulation of IK1 in action potential shortening associated with atrial fibrillation in humans. *Cardiovascular research* 2005;66:493-502.

52. Takanari H, Nalos L, Sary-Weinzinger A, et al. Efficient and specific cardiac IK(1) inhibition by a new pentamidine analogue. *Cardiovasc Res* 2013;99:203-214.

53. Noujaim SF, Stuckey JA, Ponce-Balbuena D, Ferrer-Villada T, Lopez-Izquierdo A, Pandit S, Calvo CJ, Grzeda KR, Berenfeld O, Chapula JA, Jalife J. Specific residues of the cytoplasmic domains of cardiac inward rectifier potassium channels are effective antifibrillatory targets. *FASEB J* 2010;24:4302-4312.

54. Filgueiras-Rama D, Martins RP, Mironov S, Yamazaki M, Calvo CJ, Ennis SR, Bandaru K, Noujaim SF, Kalifa J, Berenfeld O, Jalife J. Chloroquine terminates stretch-induced atrial fibrillation more effectively than flecainide in the sheep heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;5:561-570.

55. Antzelevitch C, Nesterenko V, Shryock JC, Rajamani S, Song Y, Belardinelli L. The role of late I Na in development of cardiac arrhythmias. *Handb Exp Pharmacol* 2014;221:137-168.

56. Sossalla S, Kallmeyer B, Wagner S, Mazur M, Maurer U, Toischer K, Schmitto JD, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Belardinelli L, Maier LS. Altered Na(+) currents in atrial fibrillation effects of ranolazine on arrhythmias and contractility in human atrial myocardium. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;55:2330-2342.

57. Poulet C, Wettwer E, Grunnet M, Jespersen T, Fabritz L, Matschke K, Knaut M, Ravens U. Late Sodium Current in Human Atrial Cardiomyocytes from Patients in Sinus Rhythm and Atrial Fibrillation. *PLoS One* 2015;10:e0131432.

58. Antzelevitch C, Belardinelli L, Wu L, Fraser H, Zygmunt AC, Burashnikov A, Di Diego JM, Fish JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Jr., Scornik F, Perez G. Electrophysiologic properties and antiarrhythmic actions of a novel antianginal agent. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2004;9 Suppl 1:S65-83.

59. Frommeyer G, Milberg P, Maier LS, Eckardt L. Late sodium current inhibition: the most promising antiarrhythmic principle in the near future? *Curr Med Chem* 2014;21:1271-1280.

60. Sicouri S, Belardinelli L, Antzelevitch C. Antiarrhythmic effects of the highly selective late sodium channel current blocker GS-458967. *Heart Rhythm* 2013;10:1036-1043.

61. Bonatti R, Silva AF, Batatinha JA, Sobrado LF, Machado AD, Varone BB, Nearing BD, Belardinelli L, Verrier RL. Selective late sodium current blockade with GS-458967 markedly reduces ischemia-induced atrial and ventricular repolarization alternans and ECG heterogeneity.

Heart Rhythm 2014;11:1827-1835.

62. Burashnikov A, Di Diego JM, Goodrow RJ, Jr., Belardinelli L, Antzelevitch C. Atria are More Sensitive Than Ventricles to GS-458967-Induced Inhibition of Late Sodium Current. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2015;20:501-508.

63. Carneiro JS, Bento AS, Bacic D, Nearing BD, Rajamani S, Belardinelli L, Verrier RL. The Selective Cardiac Late Sodium Current Inhibitor GS-458967 Suppresses Autonomically Triggered Atrial Fibrillation in an Intact Porcine Model. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2015;26:1364-1369.

64. Fuller H, Justo F, Nearing BD, Kahlig KM, Rajamani S, Belardinelli L, Verrier RL. Eleclazine, a new selective cardiac late sodium current inhibitor, confers concurrent protection against autonomically induced atrial premature beats, repolarization alternans and heterogeneity, and atrial fibrillation in an intact porcine model. *Heart Rhythm* 2016.

65. Justo F, Fuller H, Nearing BD, Rajamani S, Belardinelli L, Verrier RL. Inhibition of the cardiac late sodium current with eleclazine protects against ischemia-induced vulnerability to atrial fibrillation and reduces atrial and ventricular repolarization abnormalities in the absence and presence of concurrent adrenergic stimulation. *Heart Rhythm* 2016.

66. Crijns H, van Wijk L, van Gilst W, Kingma J, van Gelder I, Lie K. Acute conversion of atrial fibrillation to sinus rhythm: clinical efficacy of flecainide acetate. Comparison of two regimens. *Eur Heart J* 1988;9:634-638.

67. Aguilar M, Xiong F, Qi X-Y, Comtois P, Nattel S. Potassium Channel Blockade Enhances Atrial Fibrillation-Selective Antiarrhythmic Effects of Optimized State-Dependent Sodium Channel Blockade. *Circulation* 2015;132:2203-2211.

68. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, et al. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2006;114:e257-354.

69. Le Heuzey JY, Pazioud O, Piot O, Said MA, Copie X, Lavergne T, Guize L. Cost of care distribution in atrial fibrillation patients: the COCAF study. *Am Heart J* 2004;147:121-126.

70. Nieuwlaat R, Capucci A, Lip GY, Olsson SB, Prins MH, Nieman FH, Lopez-Sendon J, Vardas PE, Aliot E, Santini M, Crijns HJ, Euro Heart Survey I. Antithrombotic treatment in real-life atrial fibrillation patients: a report from the Euro Heart Survey on Atrial Fibrillation. *Eur Heart J* 2006;27:3018-3026.

71. Wang J, Liu J, Feng J, Nattel S. Regional and functional factors determining induction and maintenance of atrial fibrillation in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1996;271:148-158.

72. Ramirez R, Nattel S, Courtemanche M. Mathematical analysis of canine atrial action potentials: rate, regional factors, and electrical remodeling *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279: 1767-

85.

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 aim is to test the efficacy and safety of a number of novel drugs targeted at ion channels. The larger context of this work is a European network, the 'AFib TrainNet' ITN, in which a number of electrophysiologists, pharmaceutical companies and computer modellers collaborate.

As detailed under paragraph 3.1, the ion channels targets that have been identified for this project are:

1. the small conductance calcium-dependent potassium channel, I_{SK}
2. the acetylcholine-activated potassium current $I_{K,ACh}$
3. the late sodium current $I_{Na,late}$
4. the inward rectifier current I_{K1}
5. combined sodium current (I_{Na}) and potassium current (I_K) blockade

In the current project, these novel antiarrhythmic strategies will be assessed in the same species under equal conditions. This will allow their characteristics and relative merits to be evaluated and compared directly in a number different models within the goal that reflect different populations of AF patients, as detailed above.

3.3 Relevance

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

Atrial fibrillation (AF) is the most frequent cardiac arrhythmia seen clinically. In a patient suffering from AF, the regular electrical impulses generated in the heart by the sinus node are overruled by disorganized electrical impulses, making the atria "quiver" or fibrillate. As a direct result, patients suffer from palpitations, fatigue, reduced exercise tolerance and a diminished overall quality of life. This electrical disturbance also results in an uncoordinated contraction of the atrial muscle, whereby the atrial chambers do not empty properly. The result is increased risk for blood clots and thereby stroke and heart attack – this risk is increased up to five-fold as compared to a non-sufferer. Furthermore, the chaotic electrical activity of the atria is associated with additional comorbidities; i.e., it often impacts the larger chambers of the heart, the ventricles, resulting in ventricular arrhythmia. AF is thus generally associated with increased morbidity and mortality, and thereby results in reduced work capacity; both in terms of sick leave and early retirement.

AF occurs in between 1 and 2% of the general population. Currently, more than 6 million Europeans suffer from this arrhythmia, and its prevalence is expected to increase by more than two-fold during the next 40 years due to increased life expectancy of the general population. Thus, AF is said to assume epidemic proportions. The risk of the disease rises with age: about 5% of 65-year-olds and 10% of 75-year-olds are expected to suffer from AF. Due to the acute risk of blood clot formation, but also because initially short periods of AF (paroxysmal) become more persistent and

subsequently chronic,^{4, 5} AF should be diagnosed and treated as early as possible. The unmet demand for effective and safe antiarrhythmics poses not only a serious public health problem, but also an economical one, as atrial fibrillation is associated with profound healthcare costs, annual costs related to management of AF estimated to reach €13.5 billion in the European Union.^{68, 69} According to the European Society of Cardiology (ESC), at least 1% of the healthcare budget of European countries is currently spent on AF management.

Despite improvements in healthcare, the prognosis related to AF has not improved and, if anything, mortality and hospitalizations related to AF are increasing. Current options for pharmacological therapy are limited by both low efficacy and side effects, including life-threatening ventricular arrhythmias and severe extra-cardiac toxicities. The “Guidelines for the management of Atrial Fibrillation”, as published by the ESC, call for an urgent need for development of safe antiarrhythmic drugs.⁷⁰ In particular, there is an unmet need for antiarrhythmic drugs that are still efficacious in structurally remodeled atria.

This research project will explore new therapeutic targets for the treatment of AF in man. We will in-depth evaluate the effect at different stages of AF and in combination heart failure. In case of positive results this study will allow the next step towards evaluation in humans.

3.4 Research strategy

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

Justification of models of atrial fibrillation

As atrial electrophysiological properties differ substantially between different substrates for AF, the investigational compounds directed against these targets will be tested in goats with 3 weeks of AF, paroxysmal AF, in heart failure with AF and in goats with 4 months of AF. These animal models reflect distinctly different patient populations, i.e. patients with persistent and longstanding persistent 'lone AF' (AF without underlying structural heart disease) and AF with underlying structural heart disease.

Numerous previous studies have used dogs with rapid atrial pacing (RAP) for 6-8 weeks to study AF-induced remodeling. However, because dogs with RAP develop heart failure, the ventricular rate in most of these studies was controlled by creating AV block and pacing the ventricles at a slow rate. In this model, electrical remodeling develops fully, but the degree of structural remodeling is very limited, because atrial structural remodeling strongly depends on a high ventricular rate.¹⁶⁻¹⁸ Results from this model therefore reflect a state of complete electrical remodeling, without significant structural remodeling. Goats with RAP, without ventricular rate control, do not develop heart failure, even after 6 months,⁹ and are therefore more comparable to AF patients, in which progression towards heart failure during chronic AF is also a rare occurrence. AF in goats will be maintained by RAP, without ventricular rate control, as previously described.^{5, 6} We have demonstrated that 3 weeks of RAP in the goat model leads to persistent AF (i.e. non-self-terminating AF) with complete electrical remodeling, whereas 4-6 months of RAP is characterized by both complete electrical remodeling and significant structural remodeling.^{9, 12} At this later stage, conventional anti-arrhythmic drugs are no longer effective, as a result of AF-induced structural remodeling.^{8, 9}

In this project, CHF will be induced by rapid ventricular pacing (RVP). In patients, congestive heart failure (CHF) is a major risk factor for AF. About 50% of patients with severe CHF develop AF, often leading to a exacerbation of heart failure.¹⁹ Atrial remodeling induced by CHF is distinctly different from that induced by AF. Although changes in atrial cellular electrophysiology do take

place, the atrial action potential does not shorten,^{20, 21} and therefore electrical remodeling is not considered to be an important factor in the CHF-induced increase in AF stability. In contrast, widespread and dramatic atrial structural remodeling has been observed in CHF models.²⁰ The nature of atrial structural remodeling differ significantly between models of AF and CHF.²⁰ Whereas long-term AF causes endomysial fibrosis,¹² CHF causes large areas of replacement fibrosis.²⁰ The latter type of fibrosis typically occurs as a result of myocyte death, which does indeed in models of heart failure,²² but probably plays a very minor role in AF-induced remodelling.^{23, 24}

The difference between these variegated substrates for AF²⁵ is underscored by their differential sensitivity to antiarrhythmic drugs such as dofetilide²⁶ and rotigaptide²⁷, 'upstream' therapy such as pirfenidone and even electrical cardioversion.²⁸ Successful anti-arrhythmic drug treatment should be effective both in AF patients at early (electrical remodeling) and later (electrical and structural remodeling) stages of the disease, and in patients with AF caused by underlying structural heart disease, such as CHF.

To determine the range of efficacy mode of action of our novel anti-arrhythmic drugs, we will therefore test these compounds in the different stages of AF as patients may present themselves in the clinical ward. After a first evaluation (phase 1) of relevant dosing, we will start (phase 2) with the least complex manifestation of persistent AF. This will be resembled by a group of goats with an AF-duration of 3 weeks. At this stage of continuous AF maintenance AF has become non-selfterminating. The AF stability in this group is entirely dependent the degree of electrophysiological changes. Therefore it is expected that this group of animals will have a high susceptibility to drug induced AF termination. Next, in case of positive findings, in phase 3 we will further investigate the compound in models of different type of fibrosis, endomydial fibrosis (around bundles) due to prolonged existence of AF or replacement fibrosis due to heart failure. Both conditions will promote AF stability yet with distinctly different AF patterns. Finally we will determine the electrophysiological profile of the compound in the first days of paroxysmal (self terminating) AF.

Strategy

This research project is part of a European network focused on the development of new pharmacological strategies for the treatment of AF. Within this network we have a collaboration between cellular electrophysiologists, computer modelers and toxicologists. New compounds will be first tested in in vitro settings. Compounds will only be evaluated in this study if they pass toxicology tests and exhibit promising results on cellular electrophysiology. These lead compounds will be evaluated in a phased study design consisting of 3 phases.

In **phase 1**, appendix 1, we will determine the pharmacokinetic properties of the potential compounds to assess a relevant dosing regime in the goat and goat specific safety. For targets 1 to 4 (see section 3.2) one compound will be identified for further evaluation.

In **phase 2**, appendix 2, we will determine the effect of the compound(s) when AF has become non-self-terminating. Here we will explore the drug potency by performing AF termination experiments in the awake goat. Moreover, we will address basal electrophysiological properties to unravel the compounds mechanism of action at the organ level.

Based on the current potency of antiarrhythmic drugs it is expected that AF will not terminate in all goats. The resistance of AF to the drugs might be caused by cross talk between the left and right atrium. To address this potential mechanism we will measure the electrical activity at a multitude of locations on the atria. In case of left to right gradients a second group of experiments will be

included. Here we will explore the significance of the Bachmann's bundle in interatrial cross talk by performing Bachmann's bundle ablations.

In **phase 3**, appendix 3, we will further address the effects of the compounds in 3 different models of AF (paroxysmal AF, CHF combined with AF and 4 months of AF). These models reflect the different underlying structural and electrophysiological properties in different patient populations seen in clinic.

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

All studies will be performed in chronically instrumented goats allowing for repetitive electrophysiological measurements in the same experimental animal. The effects of investigational compounds on AF stability, conduction patterns and refractory period will be investigated. Also, the electrophysiological mechanism of cardioversion will be studied in these groups of goats by extensive epicardial mapping. These data and MRI data of the atrial tissue will be fed into the 3D computer models for AF, which will be used for further testing and development of antiarrhythmic drugs, potentially reducing the number of animal experiments required in future drug development.

Phase 1 (appendix 1) pharmacokinetics

The pharmacokinetic properties of the lead compounds will be evaluated in this protocol. The pharmacokinetics will be investigated in healthy goats without arrhythmia. During administration of the compound, body surface ECG recordings are performed to assess global cardiac effects. Throughout infusion and washout repetitive blood samples are taken to determine the plasma concentration. Based on these data we will establish a pharmacokinetic model that will be tested in a final experiment. During this experiment we will also perform electrophysiological measurements to screen for an antiarrhythmic potential.

These investigations will deliver the following outcome;

1. Clinical relevant dosing regime,
2. Demonstration of a potential atrial antiarrhythmic effect,
3. General cardiac effect on the ECG,
4. Safety within the goat.

Go/no go criteria to move on to phase 2 are;

1. Proof of an antiarrhythmic potential in normal atria,
2. Safety in the goat.

Phase 2 (appendix 2) effect on non-selfterminating AF in a substrate of electrical remodeling only.

Here the first evaluation of the antiarrhythmic effects of the compound(s) during AF will be assessed. We will use the goat model of short term atrial fibrillation. Goats will be implanted with electrodes around the heart for the induction and acquisition of atrial signals. AF will be induced by means of continuous monitoring of the rhythm. Consequently, the heart rhythm is paced into AF once sinus rhythm is detected. Continuous monitoring and automated pacing into AF is maintained until AF becomes non-selfterminating. Once AF has reached this point of stability, AF termination experiments will be performed. About 1 week later a final open chest experiment will be performed for detailed quantification of electrophysiological properties. High coverage and density electrical mapping, measurements of electrical activity at >500 electrodes, will give insight into the electrical

dynamics (e.g. number of waves, activation frequency, etc) of both atria. In case right to left differences are observed, we will investigate the significance of the inter-atrial interaction through the Bachmann's bundle in a second group of experiments. Here we will investigate the effect of Bachmann's bundle ablation on AF dynamics and the potency of the compound(s).

These investigations will deliver the following outcome;

- o Efficacy of the new compounds to terminate persistent AF with electrical remodeling only,
- o Insight into the mechanism of AF termination by these compounds,
- o Identification of the relevance of interatrial cross talk for AF maintenance in the presence of the antiarrhythmic compound.

Go/no go criteria to move on to phase 3 is:

- o Proof of the ability to terminate AF

phase 3 (appendix 3) effect on non-selfterminating AF in a substrates of electrical and structural remodeling.

Once the compound(s) has proven the effective to terminate AF we will further address its effects in 3 other models of AF. The compound(s) will be investigated in **1) Paroxysmal AF, 2) short term AF in combination with heart failure** and **3) non-selfterminating AF with electrical remodeling and structural remodelling**. For all models electrodes will be implanted around the heart, ventricle and atrium. The location and duration of pacing is varied dependent on the different models.

1) In the model of **paroxysmal AF** multiple awake experiments will be conducted to describe the effects in a changing electrical substrate. The goats will be implanted with electrodes on the atria and ventricle for sensing and pacing. The electrodes will exteriorized through a cable between the shoulder blades. This will allow computer programmed AF induction as above described.

During paroxysmal AF fast changes in ion current expression occurs. The effect of an antiarrhythmic drugs may vary strongly dependent on the time point of administration. Therefore we will investigate the compound(s) at 3 early time points of AF induced remodelling. In the first time point, sinus rhythm, the heart has normal electrical properties. The second time point will be after about 2 days of AF inductions. Here the episodes (paroxysms) are still relatively short (minutes) and the ion currents have undergone partial remodeling. The final time point will be at about 10-14 days of AF where remodeling of the ion currents is complete and AF episode durations are in the magnitude of hours. Remodeling in this stage of AF is still fully reversible. Therefore multiple compounds can be investigated in the same animal.

In phase 2 we evaluated the effect of new compound on 5 newly defined targets. Here we will add another target in which we investigate the combination of antiarrhythmic drugs. Note that basic properties are already described in literature and therefore do not need to go through phase 1 and 2. If for a combination a synergistic effect can be described we will do a study with this combination in phase 2 with non-selfterminating goats.

2) In a model with heart failure and short term AF

The goats will be implanted with electrodes on the atria and ventricle for sensing and pacing. The electrodes will be exteriorized through a cable between the shoulder blades. This will allow computer programmed AF induction as above described. In combination with AF heart failure will be induced. Rapid pacing of the ventricles will induce heart failure. In this model of structural remodeling, characterized by replacement fibrosis.

We will assess the potency of the compound(s) to terminate AF. Furthermore, we will explore electrophysiological effects in detail in a final experiment. Similar experiments to phase 2 are

performed in these goats.

3) Non selfterminating AF with structural remodelling

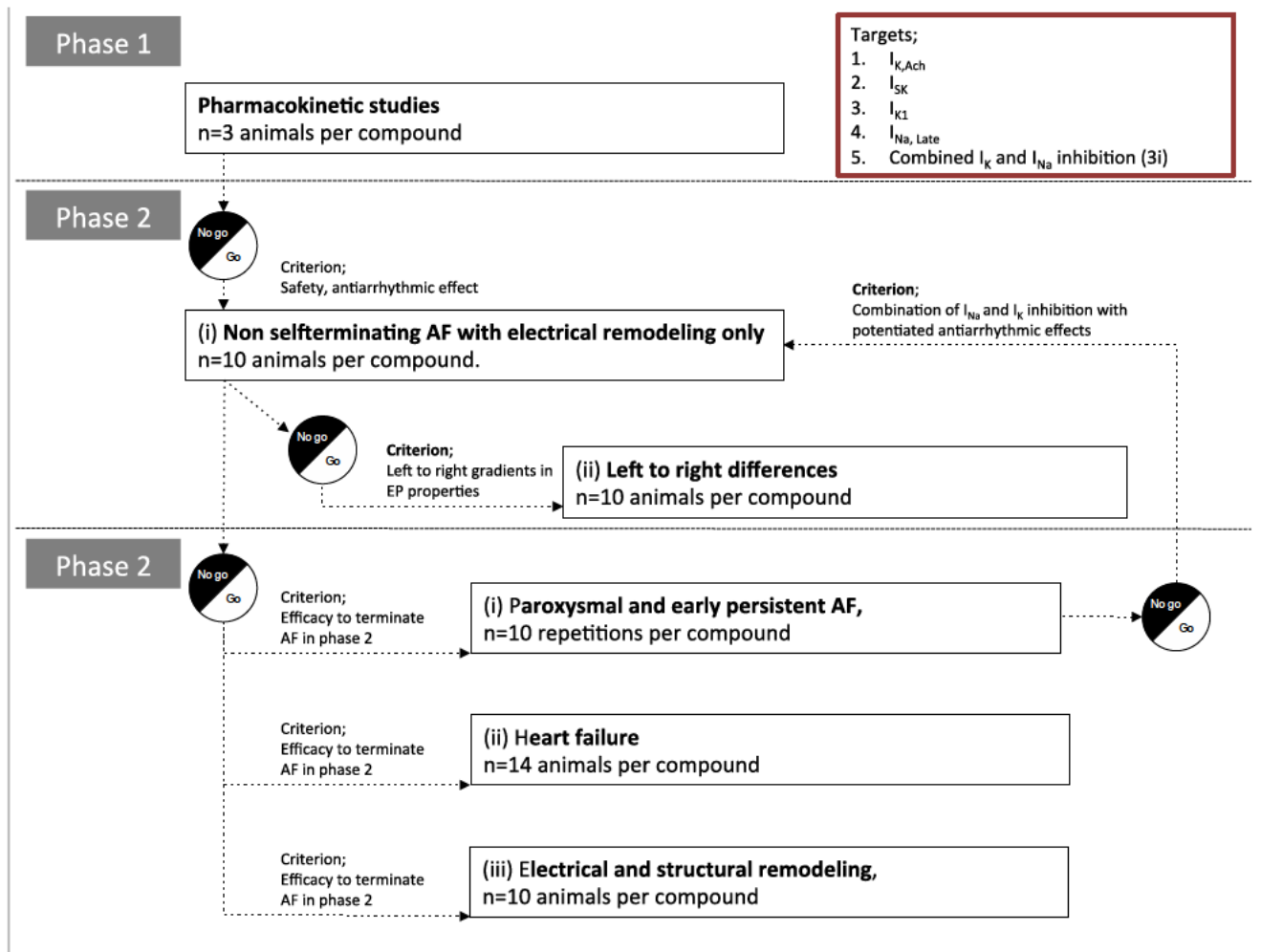
In the experiments with non-selfterminating AF with structural remodeling, we will monitor AF stability by evaluating the amenability to pharmacological termination. The goats will be implanted with electrodes on the atria and ventricle for sensing and pacing. The electrodes will be exteriorized through a cable between the shoulder blades. This will allow computer programmed AF induction as above described.

To monitor the amenability to pharmacological termination we will perform multiple AF termination experiments to identify the point where AF became resistant to antiarrhythmic drugs. To take structural changes into account as a possible cause of this resistance we will perform MRI scans of the atria. Scans to quantify the degree of structural remodeling will be performed at two time points, before AF induction and when AF has become resistant to the antiarrhythmic compound. In a finale experiment (comparable to phase 2) detailed information on the electrophysiological effect will be obtained.

These investigations will deliver the following outcome;

1. Identification if a compound has an antiarrhythmic potential at different stages of AF induced remodeling and in the presence of heart failure
2. Evaluation of the possible synergistic effect of a combination of drugs,
3. Acknowledgement if a compound can both terminate and prevent AF

A schematic overview of the project design is given below.



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.

Atrial fibrillation is an arrhythmia with a progressive nature. It starts with short-lasting episodes and progresses into a persistent state. Different aspects of AF-induced remodeling have been described to contribute to a changing substrate for this arrhythmia. However, other morbidities such as heart failure also develop a substrate for AF stabilization. The efficacy of currently available drugs are limited and dependent on the underlying substrate. An important consideration for the treatment of these patients with conventional drugs is the propensity to induce lethal ventricular arrhythmia. This project aims to establish new pharmacological treatment therapies for patients with atrial fibrillation. More specifically we aim to develop more potent and safe strategies. We have identified 5 atrial (anatomy) and/or AF specific (arrhythmia) targets to treat AF. Targets that are not exploited in current treatment options. We will investigate compounds that affect these targets in different models of AF that reflect the different patient conditions as seen in the cardiology ward. We have chosen for a phased design to explore the compounds for safety and efficacy. In phase 1 we will establish the pharmacokinetic action of the compound. The milestone in phase 1 is to prove an antiarrhythmic potential. In phase 2 we will study in detail the electrophysiological effect on AF itself. Milestones here are termination of non-selfterminating AF and a well-defined characterization of its antiarrhythmic mechanism. In phase 3 we will extend our understanding on the antiarrhythmic effect in different more complex atrial substrates. This might contribute to a future strategy that might be applicable in all patients. Otherwise our research

strategy can identify the appropriate target for a specific substrate.

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	Pharmacokinetic studies
2	Non-selfterminating AF with only electrical remodelling
3	Effects in paroxysmal AF, heart failure and permanent AF
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht university	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Pharmacokinetic studies

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This study is designed to explore new therapeutic targets for the treatment of atrial fibrillation. We aim to specify the effect of potential atrial specific targets. In this appendix we will investigate the pharmacokinetic properties, the safety and antiarrhythmic potential of the newly developed compound in the goat. These compounds are developed by our academic and industrial partners within the research network 'AFib trainet'. The compounds they identified as (most) potent on atrial cellular electrophysiological properties with no or limited effect on cells originating from the ventricle, are potential candidates. Further, all compounds are screened for biological safety before they are tested in the goat. Thus compounds chosen have proven antiarrhythmic potential with an profile that has a high biological safety.

The targets that we will asses are:

1. $I_{K,Ach}$
2. I_{sk}
3. I_{K1}
4. $I_{Na,Late}$

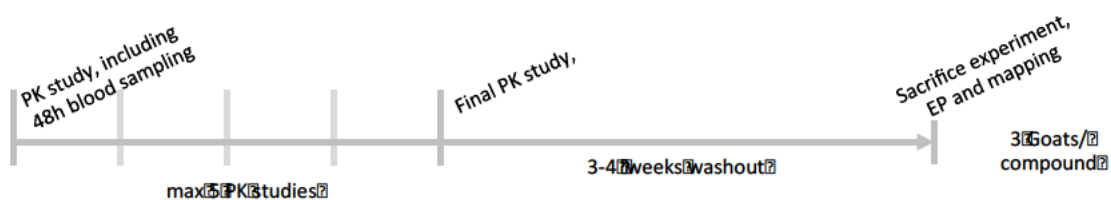
The primary outcomes of these investigations are:

1. Clinical relevant dosing regime in goats,
2. Demonstration of a potential atrial antiarrhythmic effect,
3. General cardiac effect on the ECG,

4. Safety within the goat.

Based on these studies we will decide whether to continue with the investigation of the compound. The continuation of a compound to the second phase (appendix 2) will only be performed if the

Phase 1, 3 Goats in Sinus Rhythm



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

Pharmacokinetic study

Pharmacokinetic studies (PK) are performed to determine the optimal drug infusion regimes to reach relevant predicted plasma levels, based on *in vitro* evaluations. Healthy untreated goats will be infused with the compound of interest. For the infusion of the drug we will place a intravenous line in one of the superficial veins. In consultation of a pharmacologist, dosing and infusion rates will be determined. During infusion, goats will be monitored with continuous ECG recordings and visual inspection of the physical signs. During the infusion and washout multiple blood samples will be taken to obtain plasma levels. Blood samples will be taken up to 48 hours after infusion. In the particular case that the (expected) half life of a compound is >24hours, we will draw samples (max15) up to 5 days after the infusion. In 1 goat, up to a maximum of 5 PK studies will be performed. PK studies will be executed with at least 1 week intervals. About 5 ml blood samples will be sufficient for the determination of plasma concentrations. Thus the maximal amount of blood withdrawal will be about 75ml in 2-5 days. After the last PK study, we will wait 3 to 4 week for the washout.

Sacrifice experiment

After accomplishment of the pharmacokinetics, the goats will undergo a final experiment. In this terminal experiment the effects on the surface of a healthy heart will be measured. For this terminal experiment the goat will be anesthetized. The chest will be opened to expose the heart for direct measurements of the electrophysiologic parameters. Additionally catheters will be introduced to monitor the blood pressures. Once all electrophysiological measurements will be performed, the heart will be excised for further *in vitro* analysis.

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

This phase of the project can be considered as a pilot phase. We will limit the number of animals per compound to 3. Previous studies in goats suggested that 3 animals are sufficient to model the pharmacological dynamics of different compounds. Only if the PK experiments prove to be safe and give an indication of an antiarrhythmic potential, the second phase will be initiated.

B. The animals

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

Species

We will make use of the goat model of AF, which is essential for the later phases of this project. These experiments will provide essential information about dosing in the goat. Since the experiments in phase 2 will be executed in goats, we also chose to determine the pharmacokinetics in the goat in the first phase. We chose the goat model of AF because it is well characterized and closely resembles human electrophysiology elementary characteristics such as cycle length, refractory period and number of waves.⁹⁻¹³ Heart size is crucial for AF stabilization. Smaller hearts (e.g. rodents) can not harbour chronic AF. The heart weight/size of a goat truly resembles humans heart. In a currently running project on goats, the heart weight was $323\pm 65\text{g}$, in accordance with a recent publication (2012) by the "American journal of forensic medical pathology", where Molina et al. found that the average heart weight for adult humans is $331\pm 57\text{g}$.

Sex

Female goats will be used for this study. We chose the female gender because of:

- 1) Goat studies in literature, for example reference 4-9 and 12-16, are based on female goats;
- 2) In contrast to male goats, the tranquil nature of female goat behaviour allows measurement in awake state;
- 3) The availability of male goats is limited. Most male goats are slaughtered for food consumption at young age.

Origin

The goats will be purchased from a local goat breeder.

Number of animals.

Pharmacokinetic studies will be performed in 3 animals per compound. Currently, the potential compounds are under investigation in *in vitro* studies. It might be that for each target more than one compound will be identified to have a relevant antiarrhythmic potential. We will chose the compound with the highest potential to be evaluated in the goat. However, if (although unforeseen) side effects will occur or lack of an electrophysiological effect will be shown in sacrifice experiments, we would desire to test a second best compound, according to the *in vitro* screening. Therefore, we will test a maximum of 8 compounds.

We will investigate 1 compound per target. We would like to investigate 4 targets with essentially 4 compounds (one per target). However, as mentioned above, it might occur that the compound of our first choice will not have the desired of effect or may be inappropriate in the goat. In that case we would like to be able to test our second best candidate. That results in 4 targets X 2 compounds leading to 8 conditions. Thus, 8 conditions X 3 animals make a **total number of 24 animals.**

The nature of these experiments and analysis of blood samples are simple. We believe that adjustment of the numbers is not needed on forehand.

Life stage

Size and age are important determinants for AF stabilization. Therefore, we will use adult goats with a limited range of age. Approximately 1-5 years.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X 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

These experiments are the first step towards to test the effect of the compounds on AF. In preparation of testing the therapeutic benefit of the selected compounds on AF, we will first determine pharmacokinetic properties in healthy goats. The goat is chosen with future experiments, described in appendix 2 and 3, in mind because it is a representative model of human AF. In AF a complex interaction between physiological systems in the body (inflammation, hemodynamics, neurohumoral etc.) are involved. At later phases (appendix 2 and 3) of this project, the different stages of AF-induced remodelling are crucial and therefore we need to obtain specific pharmacokinetic knowledge. This project can only be investigated in an *in vivo* model with intact physiology. The *in vitro* therapeutic targets are identified by our collaborators within this research. All targets within this study have been extensively studied in *in vitro*.

Both large and small animal models are considered. Models in rat and mice are suitable to investigate processes on a cellular level. However, due to their small heart size, any non-self-terminating AF cannot be induced. It is, instead, of great importance in this project to investigate the efficacy of the compounds in stable non-selfterminating AF. For larger animal models, dogs, pigs, sheep and goats can be considered. The drawback of dog and pig models of AF is the fast ventricular rate leading to heart failure. Therefore these models are in principle a combination of AF and heart failure. Alternatively, goats and sheep can be chosen. We have several arguments to prefer the goat model. Firstly, most AF research in awake animals is obtained in goats. Secondly, goat hearts tend to be a bit bigger resembling more the human heart size. Finally, we have a large expertise in goats and our research facilities and equipment has been developed to perform measurements in the goat.

Reduction

Reduction will be achieved by choosing the minimal number of animals to base our pharmacokinetic models on. Multiple PK studies will be done in the same animal, thereby reducing total number of on animals needed. Moreover, these experiments are a crucial go/no go time point in this project.

Refinement

The interventions in the goats will lead to limited discomfort. During the time window of frequent blood sampling an intravenous line will be placed. This will lead to the reduction of vein puncture required during blood sampling. Goats will always be group-housed in order to keep them in normal housing conditions. During the terminal experiment the animals will receive adequate general anaesthesia.

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

Upon arrival, the goats will be housed in the animal facilities to get familiar their new surrounding and care takers. Goats are domesticated animals and get quickly habituated to their new

surrounding and contact to humans. The goats will be housed with congeners and group housing. General anaesthesia (including analgesia) will be used during the terminal experiments.

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.

Target 1-3 are compounds which are newly developed. We have a direct collaboration with the developers of these compounds. Because of this short link we will be the first to test the compound in a large animal model.

All targets we will investigate in this project are also recognized by others as possible new therapeutic strategies. Individual currents and inhibition of them were investigated in a range of different electrophysiological models. Most of the published data is derived from isolated cells or wedge preparations. Only occasionally the measurements were performed in intact animal models. These models have in common that AF was always acutely induced, e.g, by stretch or autonomic stimulation. These models do not create a substrate of persistent AF (clinical setting) but need continuous drug administration for AF maintenance. Furthermore, data described in the whole animal models reflect local cellular properties but lack information on conduction properties during AF itself.

To obtain the latest state of knowledge we performed a literature review based on Pubmed.

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.

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

During the pharmacokinetic studies, repetitive blood sampling is needed. This will lead to limited discomfort and, to our opinion, does not need additional pain relieve.

For the terminal experiment general anaesthesia (including analgesia) will be used. Ecg, respiration gasses, blood pressure and physical appearance will monitor the depth of anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Adverse events due to drug administration.

Explain why these effects may emerge.

Despite toxicity screening, these compounds might lead to unexpected adverse events. These side effects might be species specific and therefore not detected in the toxicity screening phase of the drug development.

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

Firstly, all drugs underwent toxicity screening before tested in our model. Secondly, the pharmacokinetic study will be tested in a low dosage.

The goats will be frequently monitored (ecg, breathing, physical appearance) to minimize severity of possible adverse.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

- Loss of normal body condition as scored with body condition inquiries and or bodyweight loss of 25% compared to the body weight before the start of experiments. These end points apply over the whole period the goats are in protocol.
- Adverse drug events caused by the administered compound, such as neurological or gastrointestinal tract anomalies.

Indicate the likely incidence.

Body weight (5-7.5%)

It is unlikely that goats will lose weight due to the pharmacokinetic studies. Possible other reasons for body weight reduction are a lack of habituation or underlying disease gained in earlier stages of life. In DEC project a similar model was used and here 2 out of 32 goats were taken out of experiment because of a reduced body weight.

Adverse events (<1%)

We expect the likelihood of reaching humane end point to be very small. Experience with other antiarrhythmic compound has so far never led to these end points.

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 goats will experience discomfort because of 2 components in this protocol.

1 Pharmacokinetic studies → infusion line placement for blood sampling and compound infusion

2 Sacrifice experiment → induction of anaesthesia

We believe that pharmacokinetic studies causes the highest degree of discomfort.

For these pharmacokinetic studies the expected level of discomfort is **mild**.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals will be sacrificed during the final anesthetized experiment. This is essential to obtain relevant electrophysiologic measurements for the go/no go decision.

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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 2 | Non-selfterminating AF with only electrical remodelling |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

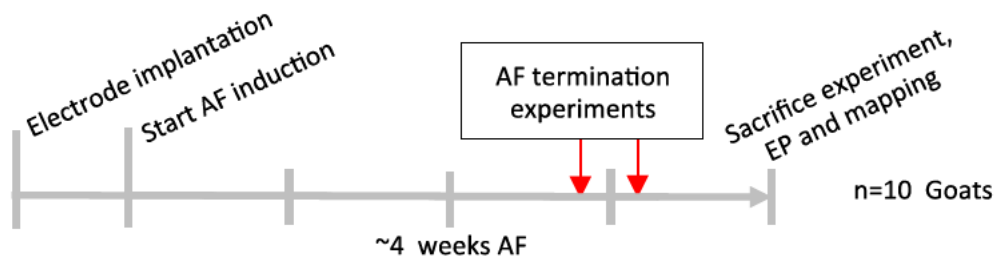
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

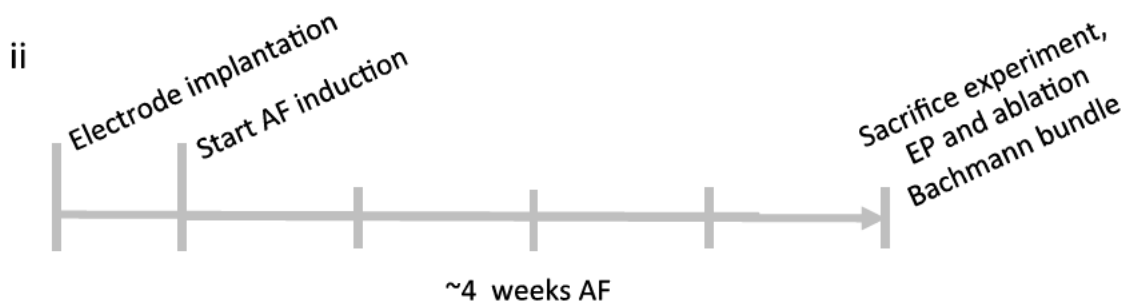
This study is designed to explore new therapeutic targets for the treatment of atrial fibrillation. We aim to specify the effect of potential atrial specific targets. These targets are either transmembrane ion currents uniquely expressed in the atrium or an optimized combination of sodium and potassium currents. In this appendix we will investigate the antiarrhythmic properties of the compounds in a model of persistent AF. Persistent AF is the stage of AF progression to a level of stability that AF does terminate spontaneously.

Phase 2i

Goats will undergo an implantation procedure by which electrodes are placed on the heart for the measurement of electrophysiological properties. A 2-3 weeks of recovery will be taken into account before the actual experiment starts. First the goats will be stimulated (paced) to induce AF. For the induction of AF the goat will be connected to an automated computer protocol. This system is able to detect normal sinus rhythm. The goat will be paced into AF once sinus rhythm is detected. The AF episodes will first last for short periods (seconds to minutes) but will progress into non-selfterminating (persistent) AF in about 2-4 weeks. This remodelling process is termed AF begets AF and accompanied by changes in electrophysiology, autonomic balance and mild structural adaptations. When AF has become non-selfterminating up to 2 AF termination (cardioversion) experiments will be performed in the awake goat. These two experiments will be performed in two consecutive weeks. During these AF termination experiments iv-lines, for compound administration and blood sampling, will be placed and atrial and ventricular signals continuously recorded. The

i





The groups and targets we will assess are dependent on the outcome 2i. Only those compounds expressing large interatrial differences in effect on the cycle length and conduction patterns of the arrhythmia will be investigated phase 2ii. In theory this might be group 1-7 from phase 2i.

The primary outcomes for phase **2ii** are;

1. We will identify differences in regional effect of the antiarrhythmic compounds,
2. We will quantify the degree of interatrial cross talk during persistent AF,
3. We will determine the relevance of interatrial cross-talk for AF maintenance in the presence of the antiarrhythmic compound.

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

Electrode implantation

The implantation will be performed under general anaesthesia. A single left sided thoracotomy will be performed to expose the left atrium. A plaque containing multiple electrodes for sensing and pacing will be placed on the heart. Before closure of the thoracic cavity signal quality will be tested. This test is performed to assure signal quality and prevention of both ventricular and phrenic nerve stimulation during AF induction. With the electrodes in the correct position, the chest will be closed and the electrode cable will be tunnelled to the back of the goat where the cable is exteriorized. A 2-3 weeks of recovery will be taken into account before the actual experiment starts.

AF maintenance

After a recovery period, the goats will be individually housed in specially designed cages for AF induction and monitoring. This restricted housing only allows one animal per cage. However, the cages are designed in such a manner that animals can see, hear and smell each other. This type of housing will be maintained until AF becomes persistent (approximately 2-4 weeks).

AF termination experiment

Cardiac signals, both atrial and ventricular, will be recorded throughout the experiment. Signals can be obtained by connecting the goat to a cardiac amplifier. In this experiment i.v. lines are placed for the infusion of the compound and blood sampling. First, measurements of baseline conditions are measured during infusion of vehicle only. After these measurements the recording is continued during infusion and part of washout of the drug. The experiment may take up to 3 hours.

Sacrifice experiment

The goats will undergo a final experiment after washout (>5 half-lives) of the last AF termination experiment. In this terminal experiment the effects on electrophysiological properties will be measured. For this terminal experiment the goats will be anesthetized. The chest will be opened to expose the heart for direct measurements electrophysiologic parameters. Additionally catheters will be introduced to monitor blood pressures. Once all measurements are performed, the heart will be excised for in vitro analysis.

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

Study design

We have considered using the baseline conditions of the individual goats to determine the effect size of the compounds. However, the measurements of the electrophysiological properties are time-consuming. This might introduce a time affect on the measurements due to unknown factors or factors that are difficult to control. Therefore we believe it is desirable to include a time matched control group. Nevertheless for each individual animal repeated measures are conducted. This will allow the use of a linear mixed model. The advantage of this approach is that subjects with missing data point(s) will not be dropped from the analysis, leading to a reduction in the number of animals.

B. The animals

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

Species

We will make use of the goat for or electrphysiological studies. Models of different stages of AF in the goat are well characterized and closely resembles human electrophysiology elementary characteristics such as cycle length, refractory period and number of waves.⁹⁻¹³ Heart size is crucial

for AF stabilization. Smaller hearts (e.g. rodents) can not harbour chronic AF. The heart weight/size truly resembles the size of humans. In a currently running project the heart weights was $323\pm 65\text{g}$ in contrast a recent publication (2012) in the American journal of forensic medical pathology Molina et al. found an average heart weight of $331\pm 57\text{g}$.

Sexe

Female goats will be used for this study. We choose the female gender because of;

- 1) Goat studies in literature, for example reference 4-9 and 12-16, are based on female goats;
- 2) In contrast to male goats, the tranquil nature of female goat behaviour allows measurement in awake goat;
- 3) Availability of male goats is limited. Most male goats are slaughtered for consumption at young age.

Origin

The goats will be purchased from a local goat breeder.

Number of animals.

Phase 2i Historic data on drug studies has shown that 8 goats are sufficient to demonstrate relevant differences after drug administration^{8,9}. Elementary electrophysiological properties like refractory period, fibrillation frequency and conduction velocity of fibrillation waves determine the number of animals. Based on previous experiments we expect a dropout of about 15%. Dropout might occur due to electrode failure, infection and technicalities during the extensive terminal experiment. We need **10 animals/group** after the correction for dropout.

The total number of animals will depend on decisions made based on our go/no go criterions.

The maximal number animals is **70goats**

Phase 2ii. The same number of animals per group apply to phase 2ii. We do not know on forhand if right to left differences are stable or specifically altered after the administration of the compounds. If we assume that all drugs have comparable effects in the left and right atrium two groups of goats (1 compound (group 1-5) and 1 control groups (7)) in phases 2ii will suffice. If different regional effects will be observed for the different compounds we might need to do these experiments for all compounds.

The maximal number animals is **60goats**

Life stage

Size and age are important determinants for AF stabilization. Therefore, we will use adult goats with a limited range of age. Approximately 1-5 years.

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 complex interaction between physiological systems in the body (inflammation, hemodynamics, neurohumoral etc.) are involved in AF induced remodelling. At later phases of this project the different stages of AF induced remodelling are crucial and therefore need to apply to this group as well. Therefore, this project can only be investigated in an *in vivo* model with intact physiology. The *in vitro* therapeutic targets are identified by our collaborators within this research. All targets within this study have been extensively studied in *in vitro*.

Both large and small animal models are considered. Models in rat and mice are suitable to investigate processes on a cellular level. However, due to their heart size no non-selfterminating AF can be induced. It is of great importance in this project to investigate the efficacy of the compounds in stable non-selfterminating AF. For larger animal models the dogs, pig sheep and goats can be considered. The drawback of dog and pig models of AF is the fast ventricular rate leading to heart failure. Therefore these models are in principle a combination of AF and heart failure. Alternatively, goats and sheep, who do not develop heart failure, can be chosen. We have several reasons to prefer the goat model. Firstly, most AF research in awake animals is obtained in goats. Secondly, goat hearts tend to be a bit bigger resembling more the human heart size. Finally, we have a large expertise in goats and our research facilities and equipment has been developed to perform measurements in the goat

Reduction

This project application constitutes a phased design. Moreover, we have chosen for a repeated measures protocol where for large part the goat can serve as its own control. In combination with a linear mixed model we will achieve high power with limited number of animals.

Refinement

The animal model has been developed in our laboratory. Over the past two decades we have adjusted a number of aspects concerning the procedures. For instance, by refining the electrode design we are able to prevent infections at the porte d'entrée. Redesign of cages allows the goats to have some freedom of movement when they are housed in their monitoring cages.

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

Upon arrival the goats will be housed in the animal facilities to get familiar their new surrounding and care takers. Goats are domesticated animals and get quickly habituated to their new surrounding and contact to humans. After surgery the goats need to be housed individually because group housing has a high risk of electrode damage. To limit this the effect of this restriction goats will always be housed with congeners. They will be able to see and each other.

General anaesthesia (including analgesia) will be used during implantation and the terminal experiments. Peri and postoperative analgesia will be applied according to the 2015 GVSOLAS guidelines for pain management of laboratory animals.

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.

Target 1-3 are compounds which are newly developed. We have a direct collaboration with the developers of these compounds. Because of this short link we will be the first to test the compound in a large animal model.

All targets we will investigate in this project are also recognized by others as possible new therapeutic strategies. Individual currents and inhibition of them were investigated in a range of different electrophysiological models. Most of the published data is derived from isolated cells or wedge preparations. Only occasionally the measurements were performed in intact animal models. These models have in common that AF was always acutely induced, e.g, by stretch or autonomic stimulation. These models do not create a substrate of persistent AF (clinical setting) but need continuous drug administration for AF maintenance. Furthermore, data described in the whole animal models reflect local cellular properties but lack information on conduction properties during AF itself.

To obtain the latest state of knowledge we performed a literature review based on Pubmed.

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

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

After surgery the goat needs to be housed individually to prevent failure of the electrodes. After recovery from surgery the goat will be housed in a smaller cage. The goat will be housed in narrow cage in which the goat can only walk backward and forward. The actual duration for AF to become persistent is highly variable but the far majority of the goats will have persistent AF within 2 weeks. In rare occasions this might be delayed to 4 weeks. This is necessary to prevent turning because the goat is connected to a computer system that controls and monitors the rhythm of the goat. Turning could potentially lead to damage to the electrodes or connection cables. The goat might also get entangled with the cable. This type of housing will start at AF induction until sacrifice.

G. Location where the animal procedures are performed

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

X 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.

X 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.

All surgical procedures will be executed under adequate general anaesthesia. The depth of anaesthesia will be monitored by ECG, respiratory gasses and physical appearance. For open chest sacrifice of goats with AF, additional blood pressure monitoring will be used since "normal" heart rate regulation absent. Due to AF an irregular and fast heart rate is present. Peri and postoperative analgesia will be applied according to the 2015 GVSOLAS guidelines for pain management of laboratory animals.

Postoperative analgesia will be given after electrode implantation.
All anaesthetic and analgetic drugs will be chosen in consultation with the designated veterinarian.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The main risk of the lone AF model in the goat are;

- infection at the porte d'entrée
- electrode failure
- confined housing
- Reduced food intake

Explain why these effects may emerge.

Infection: To allow computer control of the atrial rhythm, the connector of the electrode needs to be exteriorized. This leaves a small opening in the skin. If the cable with wires is poorly fixated, the cable could move in and out the skin leading to local infection.

Electrode failure: Multiple electrodes are needed for stimulation and sensing. Some sites on the heart may not have signal quality adequate for analysis or stimulation. Furthermore, bending and tension can break the wires. In addition, there is a risk that the goat can bite or otherwise dislocate electrode wires.

Confined housing: During the early stage of AF induction (until AF is persistent), the goat will be housed in narrow cage in which the goat can only walk backward and forward. This is necessary to prevent turning because the goat is connected to a computer system that controls and monitors the rhythm of the goat. Turning could potentially lead to damage to the electrodes or connection cables. The goat might also get entangled with the cable.

Reduced food intake: Although food intake was not affected by in previous projects, we now observed weight loss in some goats in a current project. It is still unclear yet why this occurred. It might be due to the change of location (breeder to the animal facilities), change in diet, the AF model itself or other (yet) unknown causes.

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

Infection: The design of the cable has been adopted in such a way that wound healing encapsulates the cable. The encapsulation further fixates the cable. Additionally, the goat will receive antibiotics five days post operatively.

Electrode failure: Firstly, the goat will wear harness of elastic fabric. The location of the cable and connector is covered with a resilient fabric. During computer controlled stimulation the goat needs to be housed in a cage with limited freedom of movement but may return to a normal cage once AF has become persistent. Secondly, we will implant an array of electrodes. This allows us to change sensing and stimulation sites to optimize signal quality.

Confined housing: The stables are designed in a mode the goats can see, hear and smell congeners. We chose this approach to come close to normal group housing.

Reduced food intake: Food will be daily monitored and body weight will be at least weekly monitored. We will also further investigate possible the possible factors listed above as possible confounder. To minimize this adverse effect we also adopted weight loss criterium as a human end point.

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.

- Uncontrollable infections. Infections are identified by an increased body temperature above 40°
- Pain despite adequate analgesic medication. Pain will be recognized by; piloerection; grinding of the teeth; apathy.
- reduction of body condition compared to normal in combination with bodyweight loss (max 25%)

Indicate the likely incidence.

In a previous project in adult goats, 3 out of 28 goats were taken out of protocol due to a reduction on body weight of >20%. Therefore we expect an incidence of about 10%
Note: for the animal number calculation, we have stated a total dropout rate of 15% because we expect additional missing data due to technical limitations.

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 goats will experience discomfort because of 4 components in this protocol.

1 Electrode implantation → recovery from surgery.

2 AF induction → confined housing

3 Pharmacological experiments → infusion line placement for drug infusion and blood sampling

4 Sacrifice experiment → induction of anaesthesia

We believe that electrode implantation causes the highest degree of discomfort because of the recovery from open chest implantation.

Summarized, for these studies the expected level of discomfort is **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.

The animals will be sacrificed during the final anesthetized experiment. This is essential to obtain relevant electrophysiologic measurements.

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'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht university
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 3 | Effects in paroxysmal AF, permanent AF and heart failure. |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This study is designed to explore new therapeutic targets for the treatment of atrial fibrillation. We aim to specify the effect of potential atrial specific targets. These targets are either trans-membrane ion currents uniquely expressed in the atrium or an optimized combination of sodium and potassium currents. In this appendix we will investigate the antiarrhythmic properties of the compounds in 3 models of AF.

- I. Paroxysmal and early persistent AF, the earliest stages of AF induced adaptations. Here AF is still unstable and spontaneously cardioversion occurs after minutes.
- II. AF in the presence heart failure. Heart failure will result in significant levels of fibrosis in the atria. The level of fibrosis and the presence of heart failure are strong predictors of AF. In heart failure large strands of replacement fibrosis are seen but conduction patterns are still relatively organized.
- III. Permanent AF. In this model we let AF continue to exist up to 4-6 months. This will result in moderate fibrosis and structural changes. In this model diffuse fibrosis is present in combination with high complexity of conduction patterns.

Groups and targets we will investigate are listed below. Targets 1-4 will depend on a positive outcome to restore sinus rhythm in persistent AF (2i).;

1. $I_{K\text{Achr}}$
2. I_{skr}
3. I_{K1r}

4. $I_{Na Late}$
5. Potassium channel inhibition in combination with a sodium channel inhibitor,
6. Positive control, a drug commonly used in clinical practice[#],
7. Time matched control (commonly negative control)^{*}.

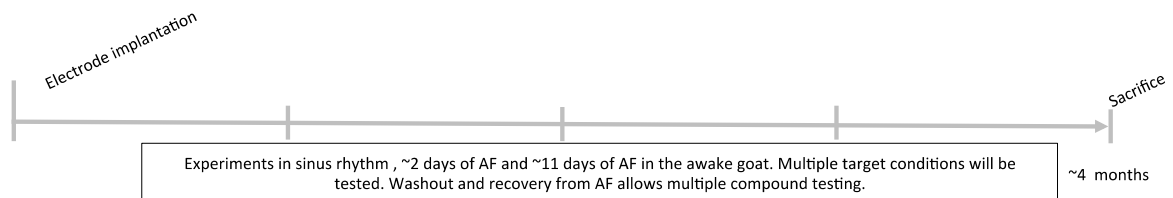
* time matched controls are included into the study to correct for possible time effects at sacrifice experiments. Because measurements will take hours a possible change may occur in electrophysiological parameters due to a change in a variety of conditions (e.g. temperature, inflammation due to surgery, anesthesia, blood loss, etc).

[#]A positive control is included to demonstrate possible superiority of the new compound(s) compared to clinical available antiarrhythmic drugs.

I. Paroxysmal AF

Goats will undergo the same implantation procedure as appendix 2. Electrodes will be placed on the heart for the measurement of electrophysiological properties in the awake goat. A 2-3 weeks of recovery will be taken into account before the actual experiment starts. In this model compound will be tested in normal sinus rhythm and early stages of AF. In this early stage, AF episodes are short lasting (paroxysmal) and terminate spontaneously. The adaptations as a result of AF induced remodelling are still reversible in this early stage of AF. Therefore, we can perform repeated experiments at 3 different stages of AF induced remodelling. Experiments will be performed in sinus rhythm when AF is absent, after 2 days of AF and after about 11 days of AF. During the experiments the goat will be infused with saline or antiarrhythmic drug and basic electrophysiological measurements will be performed. Between experiments sufficient time for drug washout and restoration of baseline electrical properties are allowed. This protocol will also be used to evaluate the combination of sodium and potassium current inhibitors. The evaluation of the combined drugs will be executed independent of the outcome of protocol 2i.

I, paroxysmal AF and early persistent AF



The primary outcomes for phase **3i** are;

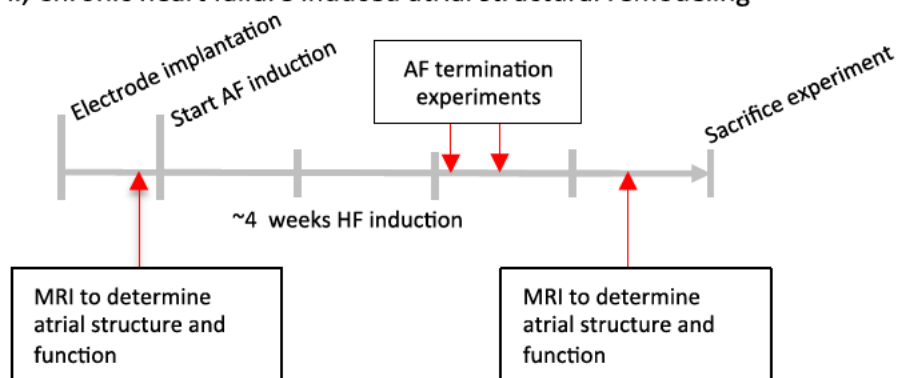
1. Identification if a compound has an antiarrhythmic potential at different stages of AF induced remodelling,
2. Evaluation of the possible synergistic effect of a combination of drugs,
3. Acknowledgement if a compound can both terminate and prevent AF

II. Heart failure in combination with AF

Goats will undergo an implantation procedure by which electrodes are placed on the heart for measurement of electrophysiological properties. A 2-3 weeks of recovery will be taken into account before the actual experiment starts. After recovery, the ventricles will be stimulated to induce heart failure. Simultaneously, AF will be induced with an automated computer protocol. This system is able to detect normal sinus rhythm. The goat will be paced into AF once sinus rhythm is detected. The AF episodes will first last for short periods (seconds to minutes), but they will progress into stable (persistent) AF in about 2-4 weeks. Heart failure and AF will be induced for a maximum of 4 weeks. When AF has become persistent up to 2 AF termination (cardioversion) experiments will be performed. During these experiments the compound will be administered and

atrial and
 To asses
 scans in
 quantify
 scan will
 after was
 After wa
 detailed
 will be p
 The tota
 the comp

ii, Chronic heart failure induced atrial structural remodeling



The prim
 1. A
 2. S

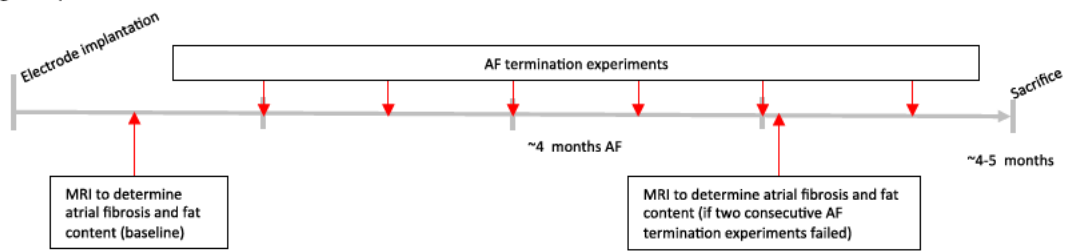
III. Peri

Goats w
 the hear
 recovery
 stimulate
 automat
 paced in
 (seconds
 Once AF
 kept in A
 Conventi

characterize this effect for the targets of investigation we will repeat cardioversion experiments with an interval of 2 weeks (max 10). No more cardioversion experiments will be performed if two consecutive experiments fail to terminate AF. The transition from persistent to drug refractory AF is accompanied with structural remodelling. To assess the amount of structural remodeling needed for a compound to fail, we will perform MRI scans in combination with recordings on the body surface. Two scans are needed to quantify the degree of structural remodelling for each goat. At the end of the protocol a terminal experiment will be executed to measure the electrophysiological properties.

The total duration of the experiment is limited to 5.5 months (recovery from surgery and AF maintenance). This protocol will only be conducted if the compound resulted in termination of AF in protocol 2i.

iii, long term persistent AF



1. Effect of the targets on the electrophysiology in atria with diffuse fibrosis,
2. The relation of structural remodelling and the efficacy of the compounds.

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

Electrode implantation (3i, ii & iii)

The implantation will be performed under general anaesthesia. A single left sided thoracotomy will be performed to expose the left atrium. A plaque containing multiple electrodes for sensing and pacing will be placed on the heart. Before closure of the thoracic cavity signal quality will be tested. This test is performed to assure signal quality and prevention of both ventricular and phrenic nerve stimulation during AF induction. With the electrodes in the correct position, the chest will be closed and the electrode cable will be tunnelled to the back of the goat where the cable is exteriorized. A 2-3 weeks of recovery will be taken into account before the actual experiment starts.

AF induction and maintenance (3i, ii & iii)

After a recovery period, the goats will be housed in specially designed cages for AF induction and monitoring. This restricted housing only allows one animal per cage. However, the cages are designed in such a manner that animals can see, hear and smell each other. The type of protocol determines the duration of this type of housing. AF induction is maintained for 2 days or 11 days for protocol 3i. For protocol 3ii and 3iii AF will be maintained until AF becomes persistent (approximately 2-4 weeks).

Electrophysiological experiments (3i)

Cardiac signals, both atrial and ventricular, will be recorded throughout the experiment. Signals can be obtained by connecting the goat to a cardiac amplifier. In this experiment, i.v. lines will be placed for the infusion of the compound and for blood sampling. First, measurements of baseline conditions are measured during infusion of vehicle only. After these measurements the recording is continued during infusion and part of washout of the drug. We will perform the electrophysiologic measurements in sinus rhythm, after ~ 2 and ~11 days of AF. The experiment may take up to 3 hours.

The goats will have limited awareness of most measurements. Occasionally we will assess certain properties at higher heart rates which the goat might experience. We believe that the combination of I.V. placement and measurements will cause mild discomfort. To prevent excessive accumulation of discomfort we will limit our experiments to 18, per animal.

Electrophysiological and AF termination experiments (3ii & 3iii)

Cardiac signals, both atrial and ventricular, will be recorded throughout the experiment. Signals can be obtained by connecting the goat to a cardiac amplifier. In this experiment an i.v. line is placed for the infusion of the vehicle and the compound. First, measurements of baseline conditions are taken during infusion of vehicle only. After these measurements, the recording is continued during infusion and part of washout of the drug. The experiment may take up to 3 hours.

MRI Scans (3ii & 3iii)

For the MRI scan the goats will be brought under general anesthesia. Before the scan, a series of electrodes will be placed on the body surface. This will allow the reconstruction of the electrical activity on the atrial activity while the structural properties are obtained through the scan. Two scans will be performed per animal.

Sacrifice experiment (3i, ii & iii)

In a terminal experiment the effects on electrophysiological properties will be measured. For this terminal experiment the goats will be anesthetized. The chest will be opened to expose the heart for direct measurements electrophysiologic parameters. Additional catheters will be introduced to monitor blood pressures. Once all measurements are performed, the heart will be excised for *in vitro* analysis.

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

Study design

For each individual animal repeated measures are conducted. This will allow the use of a linear mixed model. The advantage of this approach is that subjects with missing data points will not be dropped from the analysis, achieving a higher statistical power.

B. The animals

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

Species

We will make use of the goat for or electrophysiological studies. Models of different stages of AF in the goat are well characterized and closely resembles human electrophysiology elementary characteristics such as cycle length, refractory period and number of waves.⁹⁻¹³ Heart size is crucial for AF stabilization. Smaller hearts (e.g. rodents) can not harbour chronic AF. The heart weight/size truly resembles the size of humans. In a currently running project the heart weights was 323 ± 65 g in contrast a recent publication (2012) in the American journal of forensic medical pathology Molina et al. found an average heart weight of 331 ± 57 g.

Sex

Female goats will be used for this study. We choose the female gender because of:

- 1) Goat studies in literature, for example reference 4-9 and 12-16, are based on female goats;
- 2) In contrast to male goats, the tranquil nature of female goat behaviour allows measurement in awake goat;
- 3) Availability of male goats is limited. Most male goats are slaughtered for consumption at young age.

Origin

The goats will be purchased from a local goat breeder.

Number of animals.

3i. Paroxysmal AF

Historic data on drug studies has shown that 8 goats are sufficient to demonstrate relevant differences after drug administration^{8,9}. Elementary electrophysiological properties such as refractory period, fibrillation frequency and conduction velocity of fibrillation waves determine the number of animals. Based on previous experiments we expect a dropout of about 15%. Dropout might occur due to electrode failure, infection and technicalities during the extensive terminal experiment. We need **10 animals/compound** after the correction for dropout.

Calculation of the number of animals

- For each compound we will perform measurements at 3 time points of AF-induced remodelling. This cycle is reversible and therefore it can be repeated several times. One cycle of experiments will take about 4 weeks. This will allow **4 compound/condition testing cycles in one goat**.
- We have **5 targets and 1 control** ($I_{K,Ach}$, I_{sk} , I_{K1} , $I_{Na,Late}$ and a positive control drug) studied in previous phases of this project. Note that no time matched control is needed because the goat can serve as its own control at each condition.
- For the evaluation of the combination of sodium and potassium current inhibition we do not know yet which combination of compounds and doses will need to be evaluated. This will be dependent on the predictions based on our computer models. If we assume that we will use 1 sodium channel blocker and 2 different potassium channel blockers that will be identified as potential synergistic combinations and each drug will be tested in 2 doses will have **8 conditions to test**.

Considering the above-described variables we have a total of 14 compounds/conditions. Four of the compounds/conditions can be assessed in 1 goat. Thus, if we divide 14 by the compounds/conditions that can be assessed in one goat we get $3^{1/2}$. Rounding this up we will need 4 groups of 8 animals to be able to test all conditions. Therefore we need **a total of 32 animals.**

3ii. Heart failure in combination with AF

Historic data on drug studies has shown that 8 goat are sufficient to demonstrate relevant differences after drug administration^{8,9}. Elementary electrophysiological properties like refractory period, fibrillation frequency and conduction velocity of fibrillation waves determine the number of animals. We will accounting for a dropout of 40%. This drop out is expected to be higher than e.g. 3i. Here we have both risks of drop out AF induction and heart failure. Drop out of animals may occur due to reaching the hman end points, technical failures such as signal quality and physiological instability during anesthesia. After correction for drop out we need **14 animals/group**. We will investigate a maximum of 5 targets and use 2 control groups. This will bring the **total number of animals to 98.**

3iii. Permanent AF

Historic data on drug studies has shown that 8 goat are sufficient to demonstrate relevant differences after drug administration^{8,9}. Elementary electrophysiological properties like refractory period, fibrillation frequency and conduction velocity of fibrillation waves determine the number of animals. Based on previous experiments we expect a dropout of about 15%. Dropout might occur due to electrode failure, infection and technicalities during the extensive terminal experiment. After the correction for dropout we need **10 animals/group**. We will investigate a maximum of 5 targets and use 2 control groups.. This will bring the **total number of animals to 70.**

Life stage

Size and age are important determinants for AF stabilization. Therefore, we will use adult goats with a limited range of age. Approximately 1-5 years.

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 complex interaction between physiological systems in the body (inflammation, hemodynamic, neurohumoral etc.) are involved in AF induced remodelling. At later phases of this project the different stages of AF induced remodelling are crucial and therefore need to apply to this group as well. Therefore, this project can only be investigated in an *in vivo* model with intact physiology. Our collaborators within this research project explored the *in vitro* therapeutic targets. All targets within this study have been extensively studied in *in vitro*.

Both large and small animal models are considered. Models in rat and mice are suitable to investigate processes on a cellular level. However, due to their heart size no non-selfterminating

AF can be induced. It is of great importance in this project to investigate the efficacy of the compounds in stable non-selfterminating AF. For larger animal models the dogs, pig sheep and goats can be considered. The drawback of dog and pig models of AF is the fast ventricular rate leading to heart failure. Therefore these models are in principle a combination of AF and heart failure. Alternatively, goats and sheep can be chosen. We have several reasons to prefer the goat model. Firstly, most AF research in awake animals is obtained in goats. Secondly, goat hearts tend to be a bit bigger resembling more the human heart size. Finally, we have a large expertise in goats and our research facilities and equipment has been developed to perform measurements in the goat.

Reduction

This project application constitutes a phased design. Moreover, we have chosen for a repeated measures protocol where for large part the goat can serve as its own control. In combination with a linear mixed model we will achieve high power with limited number of animals.

Refinement

The animal model has been developed in our laboratory. Over the past two decades we have adjusted a number of aspects concerning the procedures. For instance, by refining the electrode design we are able to prevent infections at the *porte d'entrée*. Re-design of cages allows the goats to have some freedom of movement when they are housed in their monitoring cages. The technical approach of protocol 3i, 3ii and 3iii are the same except for the site of stimulation or duration of stimulation. Therefore, the above-mentioned refinements apply to all protocols. For protocol 3ii we will take additional measures to prevent rapid deterioration of ventricular function by close monitoring the ventricular function with echocardiography.

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

Upon arrival the goats will be housed in the animal facilities to get familiar their new surrounding and care takers. Goats are domesticated animals and get quickly habituated to their new surrounding and contact to humans. The goats will be housed with congeners and group housing when possible.

General anaesthesia (including analgesia) will be used during the terminal experiments.

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.

Target 1-3 are compounds which are newly developed. We have a direct collaboration with the developers of these compounds. Because of this short link we will be the first to test the compound in a large animal model.

All targets we will investigate in this project are also recognized by others as possible new therapeutic strategies. Individual currents and inhibition of them were investigated in a range of different electrophysiological models. Most of the published data is derived from isolated cells or wedge preparations. Only occasionally the measurements were performed in intact animal models. These models have in common that AF was always acutely induced, e.g, by stretch or autonomic stimulation. These models do not create a substrate of persistent AF (clinical setting) but need continuous drug administration for AF maintenance. Furthermore, data described in the whole animal models reflect local cellular properties but lack information on conduction properties during AF itself.

To obtain the latest state of knowledge we performed a literature review based on Pubmed.

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

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

3i. Paroxysmal AF

Goats will need to be individually housed to prevent failure of the implanted electrodes. Majority of the time the goat will be housed in a normal cage.

However for the time points of 2 days of AF and 11 days of AF the goat needs to be housed for the limited time periods, in a designated cage for AF maintenance. In this narrow cage the goat is connected with cable to a computer system for rhythm management. The goat can only walk back and forward. This is necessary to prevent turning, turning could potentially lead to damage to the electrodes or connection cables. The goat might also get entangled with the cable.

3ii. Heart failure and AF

After surgery the goat needs to be housed individually to prevent failure of the electrodes. After recovery from surgery the goat will be housed in a smaller cage. In this narrow cage the goat is connected with cable to a computer system for rhythm management. The goat can only walk back and forward. This is necessary to prevent turning, turning could potentially lead to damage to the electrodes or connection cables. The goat might also get entangled with the cable. This type of housing will be continued until the goat will be sacrificed.

3iii. Permanent AF

After surgery the goat needs to be housed individually to prevent failure of the electrodes. After recovery from surgery the goat will be housed in a smaller cage. In this narrow cage the goat is connected with cable to a computer system for rhythm management. The goat can only walk back and forward. This is necessary to prevent turning, turning could potentially lead to damage to the electrodes or connection cables. The goat might also get entangled with the cable. This type of housing will be continued until AF has become persistent. Once AF has become persistent no continuous monitoring is needed and the goat will be housed in a normal sized cage. However we will house the goat in the narrow cage after each AF termination experiment to assure that AF is maintained when the drug is washed out.

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?

X 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.

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

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

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

All surgical procedures will be executed under adequate general anaesthesia. Peri and postoperative analgesia will be applied according to the 2015 GVSOLAS guidelines for pain management of laboratory animals.

The depth of anaesthesia will be monitored by ECG, respiratory gasses and physical appearance. For open chest sacrifice of goats with AF, additional blood pressure monitoring will be used since "normal" heart rate regulation absent due to AF an irregular and fast heart rate is present.

All anaesthetic and analgetic drugs will be chosen in consultation with the designated veterinarian.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Infection (3i, ii & iii)

The main risks of the lone AF model in the goat are infection at the porte d'entrée and electrode failure.

Electrode failure and confined housing (3i, ii & iii)

Decompensating heart failure (3ii)

Goats in the heart failure group might also experience progressive deterioration of ventricular function leading to acute decompensation.

Reduced food intake (3i, ii & iii)

Explain why these effects may emerge.

Infection (3i, ii & iii)

To allow computer control of the atrial rhythm, the connector of the electrode needs to be exteriorized. This leaves a small opening in the skin. If the cable with wires is poorly fixated, the cable could move in and out the skin leading to local infection.

Electrode failure (3i, ii & iii)

Multiple electrodes are needed for stimulation and sensing. Some sites on the heart may not have signal quality adequate for analysis or stimulation. Furthermore, bending and tension can break the wires. In addition, there is a risk that the goat can bite or otherwise dislocate electrode wires.

Confined housing (3i, ii & iii)

During the early stage of AF induction (until AF is persistent), the goat will be housed in narrow

cage in which the goat can only walk backward and forward. This is necessary to prevent turning because the goat is connected to a computer system that controls and monitors the rhythm of the goat. Turning could potentially lead to damage to the electrodes or connection cables. The goat might also get entangled with the cable.

Decompensating heart failure (3ii)

The sensitivity to CHF can have rather large variation. Therefore, despite intensive monitoring irreversible heart failure may occur.

Reduced food intake

Although food intake was not affected by in previous projects, we now observed weight loss in some goats in a current project. It is still unclear why this occurred. It might be due to the change of location (breeder to the animal facilities), change in diet, the AF model itself or other (yet) unknown causes.

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

Infection (3i, ii & iii)

The design of the cable has been adopted in such a way that wound healing encapsulates the cable. The encapsulation further fixates the cable. Additionally, the goat will receive antibiotics five days post operatively.

Electrode failure (3i, ii & iii)

Firstly, the goat will wear harness of elastic fabric. The location of the cable and connector is covered with a resilient fabric. Secondly, during computer controlled stimulation the goat needs to be housed in a cage with limited freedom of movement but may return to a normal cage once AF has become persistent. Thirdly, we will implant an array of electrodes. This allows us to change sensing and stimulation sites to optimize signal quality.

Confined housing (3i, ii & iii)

The stables are designed in a mode the goats can see, hear and smell congeners. We chose this approach to come close to normal group housing.

Decompensating heart failure (3ii)

Frequent echodiography will be performed. In case of a rapid drop of cardiac function the pacemaker frequency will be reduced and diuretics will be given.

Reduced food intake

Food will be daily monitored and body weight will be at least weekly monitored. We will also further investigate possible the possible factors listed above as possible comfounder. To minimize this adverse effect we also adopted weight loss criterium as a human end point.

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.

- Uncontrollable infections. Infections are identified by an increased body temperature above

40°

- Pain despite adequate analgesic medication. Pain will be recognized by; piloerection; grinding of the teeth; apathy.
- reduction of body condition compared to normal in combination with bodyweight loss (max 25%)
- **3ii specific.** Acute decompensation due to heart failure. Heart failure may be identified by ascites, impaired breathing (tachypnea, cyanosis) due to pulmonary edema, edema in the periphery* (anasacra) and strongly reduced cardiac function based on echo parameters. Edema on the chest wall will occur after surgical implantation of the electrodes. This transient edema in reaction to surgery will not be considered as a humane end point.

Indicate the likely incidence.

In a previous project in adult goats, 3 out of 28 goats were taken out of protocol due to a reduction on body weight of >20%. Therefore we expect an incidence of about 10%. Note: for the animal number calculation, we have stated a total dropout rate of 15% because we expect additional missing data due to technical limitations.
For group 3ii we expect a higher degree of dropout due to acute decompensation during CHF induction. Therefore we have account for a total drop out of 40%.

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').

3i The goats will experience discomfort because of 4 components in this protocol.

- 1 Electrode implantation → recovery from surgery.
- 2 AF induction → confined housing
- 3 Pharmacological experiments → infusion line placement for drug infusion and blood sampling
- 4 Sacrifice experiment → induction of anaesthesia

We believe that electrode implantation causes the highest degree of discomfort because of the recovery from open chest implantation.

For these experiments the expected level of discomfort is **moderate**.

3ii The goats will experience discomfort because of 5 components in this protocol.

- 1 Electrode implantation → recovery from surgery.
- 2 AF induction → confined housing
- 3 Heart failure → animals might go into acute decompensation leading to dyspnea and severely reduced cardiac performance
- 4 Pharmacological experiments → infusion line placement for drug infusion and blood sampling
- 5 Sacrifice experiment → induction of anaesthesia

We believe that heart failure causes the highest degree of discomfort .

For these experiments the expected level of discomfort is **severe**.

3iii The goats will experience discomfort because of 4 components in this protocol.

- 1 Electrode implantation → recovery from surgery.
- 2 AF induction → confined housing
- 3 Pharmacological experiments → infusion line placement for drug infusion and blood sampling
- 4 Sacrifice experiment → induction of anaesthesia

We believe that electrode implantation causes the highest degree of discomfort because of the recovery from open chest implantation.

For these experiments the expected level of discomfort is **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.

The animals will be sacrificed during the final anesthetized experiment. This is essential to obtain relevant electrophysiologic measurements.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002016782

Bijlagen

2

Datum 15 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 december 2016. Het gaat om uw project "Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002016782. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

15 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD107002016782

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
15 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD107002016782

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]

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 februari 2017
Geplande einddatum: 1 februari 2022
Titel project: Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation.
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor de behandeling van boezemfibrileren
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616, 6200MD Maastricht
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.441,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Maastricht

Datum:

14 december 2016

Datum:

15 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD107002016782



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002016782

Bijlagen

2

Datum 15 december 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 15 december 2016

Vervaldatum: 14 januari 2017

Factuurnummer: 16700782

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002016782	€ 1.441,00

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

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 1 februari 2017 10:55
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD107002016782

Geachte [REDACTED]

De juiste versie van de brief is bij het dossier gevoegd. Uw antwoord is voldoende om het dossier compleet te maken, De CCD heeft besloten uw aanvraag te vergunnen zoals aangevraagd. U ontvangt nog deze week de beschikking en vergunning,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

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

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 1 februari 2017 9:27
Aan: Info-zbo
Onderwerp: Re: vraag bij de behandeling van AVD107002016782

Beste,

Ik kom er net achter dat ik gister avond de verkeerde versie van de antwoordbrief heb toe gestuurd. Hopelijk ben ik nog op tijd voor de verwerking hiervan. Bij deze wil ik de juiste versie indienen.

Groeten,
[REDACTED]

From: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Date: Tuesday, 31 January 2017 at 14:55
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: RE: vraag bij de behandeling van AVD107002016782

Geachte [REDACTED]

Op 12 januari heeft de CCD u onderstaande vraag voorgelegd. Door storingen in de mailbox kan het zijn dat wij uw antwoord niet ontvangen hebben. Zou u dit nogmaals in kunnen sturen of wanneer u nog niet heeft geantwoord dit willen doen?

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

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

Van: Info-zbo

Verzonden: donderdag 12 januari 2017 14:20

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: vraag bij de behandeling van AVD107002016782

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Het betreft uw project "Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation" met aanvraagnummer AVD107002016782. Uw aanvraag is behandeld in de afgelopen CCD vergadering en de CCD wil u vragen de aanvraag aan te vullen voordat een besluit genomen kan worden. U beschrijft in uw aanvraag het uitvoeren van *in vitro* experimenten voordat u onderzoek in proefdieren gaat uitvoeren. De beschreven *in vitro* studies hebben betrekking op de functionaliteit van de te selecteren componenten. Zijn er ook *in vitro* studies uitgevoerd die betrekking hebben op de effectiviteit van een component en zou dit de opzet van de dierstudies zoals beschreven in bijlage 3.4.4.1 verder kunnen verfijnen door kinetisch moduleren/ PK-PD (in vitro, in silico, andere diermodellen)?

Kunt u dit toelichten? De behandeltijd van uw aanvraag is opgeschort todat uw aanvullingen ontvangen zijn, met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

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

Van: Dec Secretariaat [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 10 januari 2017 8:43
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: vraag om aanvullend advies bij AVD107002016782

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte commissie,

Hierbij de reactie van de DEC-UM:

Het betreft een thoracotomie bij geiten ten behoeve van plaatsing van 1 electrode-plaatje op een atrium met postoperatief (indien noodzakelijk pijnstilling en) huisvesting gedurende 2-4 weken in een hok, waarin de dieren niet kunnen omdraaien, maar wel contact kunnen onderhouden met soortgenoten in dezelfde ruimte. De betreffende operatie wordt uitgevoerd onder algehele anesthesie en is daarmee te classificeren als matig. Voor de uiteindelijke inschatting van het totale ongerief moet natuurlijk tevens de postoperatieve huisvesting gedurende 2-4 weken in een hok, waarin de dieren niet kunnen omdraaien worden meegewogen. In de EU richtlijn wordt aan huisvesting in een metabole kooi met matige beperking van de bewegingsvrijheid gedurende een langere periode (tot en met 5 dagen) als ongeriefsclassificatie matig toegekend. In de EU richtlijn wordt tevens aangegeven belang te hechten aan de diersoort bij de definitieve indeling van de procedure naar ernst. In de landbouwhuisdiersector was het niet ongebruikelijk herkauwers en paarden aangebonden te huisvesten gedurende meerdere (winter)maanden, waarbij de bewegingsvrijheid beperkt was ondermeer ten aanzien van de mogelijkheid zich te keren. Deze klassieke huisvestingsmethode is bezwaarlijk als matig ongerief te classificeren indachtig de persoonlijke verzorging de dieren ondermeer middels borstelen door de veehouder. De DEC-UM heeft goede nota genomen van de opmerking onder verfijning in het betreffende PV dat "Redesign of cages allows the goats to have some freedom of movement when they are housed in their monitoring cages" oftewel er is meer bewegingsvrijheid in vergelijking tot aangebonden herkauwers ter verfijning, maar nog immer de onmogelijkheid te keren. Naar de mening van de DEC-UM is het totale ongerief bij deze geiten zeer wel passend bij matig mede indachtig het feit dat de operatie ook niet als zeer zwaar kan worden beschouwd. De classificatie ernstig ongerief lijkt echter een overmatige classificatie daar de procedure, zoals die wordt toegepast bij deze geiten, niet vergelijkbaar lijkt met het ongerief bij procedures als 'immobilisatiestress om hartstilstand bij ratten te induceren' of een test 'met gedwongen zwemsessies of oefeningen met uitputting als eindpunt'.

De DEC-UM hoopt hiermee uw verzoek volledig te hebben beantwoord.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Ambtelijk secretaris Dierexperimentencommissie
[REDACTED] **DEC-UM**

[REDACTED]
[REDACTED]
www.maastrichtuniversity.nl/dec

Postbus 616, box 48, 6200 MD Maastricht
[REDACTED]

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: donderdag 5 januari 2017 11:55
To: Dec Secretariaat [REDACTED]
Subject: vraag om aanvullend advies bij AVD107002016782

Geachte leden van DEC-UM,

U heeft aan de CCD advies uitgebracht over aanvraag AVD107002016782 getiteld: "Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation.". Bij de behandeling van deze aanvraag zou de CCD u om aanvullend advies willen vragen over de beschreven ongerief classificatie. De dieren ondergaan een invasieve open thorax chirurgie en worden anders dan in bijlage III van de Richtlijn gehuisvest. De afwijkende huisvesting beperkt de dieren in hun bewegingsvrijheid, ze kunnen beperkt alleen voor- en achterwaarts bewegen en deze vorm van huisvesten kan minimaal 2-4 weken duren. In combinatie met de invasieve chirurgie kan de CCD zich voorstellen dat het cumulatief ongerief voor de dieren die dit betreft (bijlage 3.4.4.2 en gedeeltelijk uit bijlage 3..4.4.3) eerder als ernstig dan als matig geassocieerd moet worden. Uit onderdeel K. in de bijlage dierproeven :
"We believe that electrode implantation causes the highest degree of discomfort because of the recovery from open chest implantation"

Lijkt er geen rekening gehouden met dit cumulatieve effect maar is de ongerief classificatie afgeleid van de procedure die op zichzelf het hoogste ongerief veroorzaakt.

Graag hoort de CCD hier uw aanvullende advies over,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

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

DEC-advies PV 2016-013/ [REDACTED]

Preambule:

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation.*
3. **Titel van de NTS:** *Ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor de behandeling van boezemfibrileren.*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe** aanvraag projectvergunning
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC; *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon; [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon; [REDACTED]
6. **Adviestraject:** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC-UM 03-11-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken 11-11-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. **Afstemming IvD:**
 - De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD *dd. 03-11-2016.*
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum 16-11-2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:

3.1 Achtergrond

Algemene opmerking:

1. **Vraag:** U geeft aan cardiale fibrose te willen monitoren middels MRI. Hiertoe dienen de dieren tweemaal te worden blootgesteld aan anesthesie. Heeft U monitoring van fibrose middels bloedonderzoek overwogen als alternatief hiervoor?

Antwoord:

Vorming van fibrose in het atrium is een lokaal proces. Een aantal lokale stimuli zoals lokale ischemie, rek en inflammatie factoren uitgescheiden door adipocyten zijn de aanleiding tot de vorming van fibrose.

Vanwege van dit zeer lokale karakter zijn deze markers niet meetbaar in het bloed of anders niet specifiek voor het atriale remodellingsproces. Bovendien zal de MRI-scan de anatomische locatie identificeren. De samenhang van zowel fibrose als golfpatronen zal bijdragen in het begrip van het mechanisme van een antiaritmicum.

Geen aanpassing van het protocol uitgevoerd.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.2

Algemene opmerking:

1. De DEC-UM zou het verschil tussen fase 2 en 3 iets meer gedefinieerd willen zien. Er wordt gesproken over "these models". De DEC-UM adviseert deze te benoemen.

Reactie:

Onder punt 3.4.1 en 3.4.2 is nu explicieter aangegeven dat het in essentie om 4 modellen van AF gaan. Een zelf terminerend AF model (paroxysmal), een niet-zelf terminerend model zonder fibrose, en 2 modellen van niet-zelf terminerend AF met 2 verschillende types van fibrose

De tekst is aangepast en in grijs gearceerd.

3.4.4

Appendix 1

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. **Vraag:** Waar baseert u de keuzes van de stoffen op?

Antwoord:

In de tekst wordt nu aangegeven dat alleen stoffen worden getest die in *in vitro* studies een werkelijk elektrofysiologisch effect hebben aangetoond. Daarnaast wordt de stof op toxiciteit gescreend. Die stoffen met een profiel van een goede toepasbaarheid worden gekozen.

De tekst is aangepast en in grijs gearceerd.

B. De Dieren.

2. **Vraag:** U beschrijft onder aantallen het gebruik van 8 compounds, in de volgende zin schrijft U 4 targets, 2 compounds. Dat begrijpt de DEC-UM niet, test U 8 stoffen of 2 stoffen in 4 targets, kunt U dit verduidelijken?

Antwoord:

We zullen altijd maar 1 target beïnvloeden met 1 enkele stof. Dus als alle stoffen effectief zijn en geen gevaar voor de dieren opleveren hebben we $4 \times 3 = 12$ dieren nodig. Effect en veiligheid is hier gekozen als go/no go moment. Mocht het blijken dat het de compound van onze eerste keuze geen positieve keuze oplevert, willen we een tweede kandidaat compound kunnen testen. Uiteraard moet in *in vitro* studies deze compound een relevant elektrofysiologisch effect hebben. Mocht dit in het ergste geval in alle 4 de targets voorkomen dan moeten we alle experimenten opnieuw doen. Dus $2 \times 12 = 24$ dieren

In het protocol is nu de tekst uitgebreid om deze overweging helderder over te brengen.

3. **Vraag:** U spreekt van een limited range of age. U kiest er echter voor dieren te gebruiken in de leeftijd van 1-5 jaar? Is dat niet tegenstrijdig?

Antwoord:

Geiten kunnen ongeveer 8 tot 12 jaar oud worden. In dat opzicht is 1-5 jaar een "limited range". We zijn het met de commissie eens dat dit wel een zeer breed bereik is. We hebben echter dit bereik op advies van de IVD verbreed naar 1-5 jaar. De argumentatie hierbij is dat de geiten niet direct voor onderzoeksdoeleinden worden gefokt en daardoor beschikbaarheid niet altijd gegarandeerd kan worden. Vanuit wetenschappelijk oogpunt is het vooral van belang dat de dieren nog van jonge leeftijd zijn (<5 jaar) en dat alle groepen in hetzelfde leeftijdsbereik bevinden. Bijvoorbeeld allemaal van 1-3jaar of anders van 3-5 jaar. Op basis van praktische overwegingen gaat de voorkeur uit naar 1-3 jaar.

Geen aanpassing van het protocol uitgevoerd.

4. **Vraag:** Is er iets bekend over uitval? Gaarne toelichten.

Antwoord:

Er wordt geen rekening gehouden met uitval. De analyses (plasma concentratie) en handelingen (plaatsing van infuuslijnen) zijn makkelijk uitvoerbaar. Daarnaast laat het afgenomen bloedvolume toe om meerdere plasma analyses uit te voeren. Omdat de geit meerdere grote oppervlakkige venen heeft zal het plaatsen van een infuus ook geen probleem opleveren. Daarom denken we geen rekening dienen te houden met uitval.

Geen aanpassing van het protocol uitgevoerd.

J. Humane eindpunten.

5. **Vraag:** Gaarne periode van gewichtsverlies aangeven. Zou disfunctie van het cardiovasculair systeem hier ook niet misstaan, zoals ontstaan van oedeem? Moet hier uitgebreidere infectie ook niet worden vermeld evenals bij andere appendices?

Antwoord:

De periode is nu aangegeven.

In deze appendix wordt geen AF opgewekt. De stoffen worden enkel aan gezonde dieren gegeven om de farmacokinetiek te kunnen berekenen. Dientengevolge worden voor deze experimenten geen elektrodes geïmplanteerd en wordt de cardiale functie niet door ritmestoornissen beïnvloed. Er is daarom geen reden om cardiovasculair gerelateerde complicaties, zoals oedeem, te verwachten. Dit geldt ook voor de elektrodes, deze worden niet geïmplanteerd en kunnen daardoor niet tot een ontsteking leiden.

Om te onderstrepen dat in de groep dieren onder appendix 1 enkel gezonde (niet geopereerde) dieren gebruikt worden is in sectie A van appendix 1 en in paragraaf 3.4.2 bij de beschrijving van stage 1, expliciet vermeld dat de dieren geen ritmestoornissen hebben.

De tekst is aangepast en in grijs gearceerd.

6. **Vraag:** In de humane eindpunten noemt u geen effecten van het opwekken van AF, is dat noodzakelijk en kunt u de (bij)effecten eventueel weergeven als humaan eindpunt of is dat zinloos?

Antwoord:

Zoals onder punt aangegeven wordt in deze dieren geen AF opgewekt.

Appendix 2

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. **Vraag:** I.c.m. 2: U wilt "time matched controls" gebruiken, Uw leeftijd range varieert echter van 1-5 jaar. Kunt U, indien U bang bent voor effecten in de tijd mogelijk gerelateerd aan de fysiologische veroudering, een smallere leeftijd kiezen of is dat niet noodzakelijk?

Antwoord:

De keuze voor een time-matched control is niet gemaakt op basis van fysiologische veroudering maar op basis van elektrofyysiologische veranderingen die tijdens of ten gevolge het experiment kunnen optreden. In het "sacrifice experiment" kunnen twee potentiële versturende factoren onze metingen beïnvloeden.

1. De AF terminatie experimenten kunnen theoretisch een residueel effect hebben op het elektrische gedrag. Dit is niet waarschijnlijk omdat uit eerdere studies is gebleken dat herhaaldelijk initiëren en termineren van AF geen effect heeft op basale elektrofyysiologische parameters in een normaal hart of een hart met kort durend AF.
2. Een belangrijker punt is de duur van het "sacrifice experiment" zelf (daarom time matched). Gedurende uren zullen metingen op het oppervlak van het hart uitgevoerd worden. We weten uit eerdere experimenten dat over een 1 uur het AF patroon stabiel is. Over langere periodes, zoals de totale duur van het experiment, hebben we echter geen informatie. Het experiment is zo gekozen dat de eerste metingen in een hart met AF en een fysiologisch zout infuus wordt uitgevoerd.

Daarna zullen identiek dezelfde metingen worden herhaald in de afwezigheid van de compound. Naar verwachting zal het gehele meetprotocol >5 uur duren. In deze periode kunnen veranderingen in externe factoren (temperatuur, anesthesie, compositie van het bloed, inflammatie etc.) plaats vinden die mogelijk de metingen verstoren. Helaas kan een cross-over protocol niet opgezet worden i.v.m. de washout tijd van de compounds welke het protocol langer zal maken. Om niet ten onrechte veranderingen aan de compound toe wijzen willen we een time-matched controle includeren.

In de uiteindelijke studie zal in een kleinere leeftijdsgroep gehanteerd worden. Waarschijnlijk 1-3 jaar. Op basis van de mogelijkheden bij de start van het project zal hierin een definitieve keuze gemaakt worden.

In appendix 2 en 3 staan de functie van de positieve en negatieve controle nu expliciet benoemd.

J. Humane eindpunten.

2. **Vraag:** Zou disfunctie van het cardiovasculair systeem hier ook niet misstaan, zoals ontstaan van oedeem?

Antwoord:

Tijdens AF hebben de geiten een snelle en chaotische activiteit in de atria. Ondanks deze snelle activiteit is in de geit de frequentie in de kamers beperkt. Dit is een groot voordeel van het geiten model van AF t.o.v. andere grote dier modellen omdat de geit geen contractiele disfunctie ontwikkeld. In meerdere projecten hebben we na maanden van AF geen verandering in hartminuut volume, linker kamerfunctie of oedeem vorming geconstateerd. Dit punt wordt benoemd onder het kopje "replacement" van deze appendix en onder punt 3.4.1.

Ter verheldering is nu het uitblijven van heart failure expliciet benoemd.

3. **Vraag:** Hoe ziet u hier AF zelf? Kan dat een reden zijn voor een humaan eindpunt?

Antwoord:

Het welzijn bij patiënten met AF wordt door met name drie aspecten beïnvloed.

1. Afname van inspanningstolerantie. Patiënten met een gecompromiteerde pompfunctie kunnen tijdens een AF aanval een sterke afname van inspanningstolerantie ervaren. Echter bij patiënten met een normale pompfunctie is het acuut wegvallen van de atriale bijdrage aan de pompfunctie van beperkte waarde. Dit wordt ook geïllustreerd door het relatief vaak voorkomen van asymptomatisch AF. Zoals beschreven het antwoord op vraag 2 van appendix 2 leidt AF ook op lange termijn niet tot een verstoorde pomp functie. De geiten hebben daarom dus geen hinder van een verminderde cardiovasculaire functie.
2. Palpaties of het ervaren van de onregelmatige hartslag. Een zeer groot aantal episodes van AF wordt niet door patiënten ervaren. Dit neemt niet weg dat voor een bepaalde groep patiënten het hebben van een onregelmatige het leven ernstig beïnvloed. Echter bij het opwekken van AF, met een lage stroomsterkte van de stimulator, is nooit enige reactie van de geit te zien. Verder neemt de fysieke activiteit van de geit ook niet af.
3. Complicaties van trombo-embolische events. Het grootste gevaar van AF is de vorming van stolsels in de atria. Indien deze losschieten kan dit tot een beroerte leiden. In de vele jaren van AF onderzoek in ons lab, hebben wij in de geit geen events geïdentificeerd die bijvoorbeeld leidde tot neurologisch consequenties voor de geit.

Op basis van deze overwegingen denken we dat AF zelf geen (meetbaar) effect heeft op het welzijn van de geit. Daarom verwachten wij geen extra humane eindpunten te moeten opnemen.

Geen aanpassing van het protocol uitgevoerd.

Appendix 3

Vragen:

B. De Dieren.

1. **Vraag:** U geeft aan dat een groepsgrootte van 8 dieren voldoende ("sufficient") is. Kan het niet met minder?

Antwoord:

Voor sommige parameters zoals bijvoorbeeld een refractaire periode zou een kleiner aantal dieren misschien mogelijk zijn. Maar om het elektrofysiologische mechanisme dat bijdraagt aan het termineren van AF zijn een combinatie van verschillende factoren van belang. Een greep aan parameters zijn bijvoorbeeld de activatie frequentie, snelheid van geleiding, het aantal golven, ectope activiteit etc. De samenhang van deze parameters bepaald in welke theoretische concepten het effect van de compound past. Uit ervaring van eerdere projecten blijkt dat ongeveer 8 dieren afdoende zijn.
Geen aanpassing van het protocol uitgevoerd.

2. **Vraag:** Ook hier de vraag waar baseert U de aantallen targets op, waarom komt U tot deze aantallen? Waarvoor gebruikt U twee controle groepen?

Antwoord:

Deze vraag is voor ons niet geheel helder. Hopelijk beantwoorden we hieronder de vragen van de DEC.

Het aantal targets dat wij willen bestuderen wordt door een aantal aspecten bepaald. Zoals in de achtergrond van de PV staat beschreven zijn we van mening dat target 1-5 wetenschappelijk en klinisch interessant zijn. Deze targets zijn atriaal en of AF specifiek. Voor al deze targets zijn stoffen in ontwikkeling binnen ons netwerk. De beschikbaarheid van compounds, met een bewezen antiaritmische potentie in vitro, bepalen welke targets bestudeerd kunnen worden. In theorie is het mogelijk dat alle targets bestudeerd worden.

De time-matched controle wordt alleen gebruikt in de modellen "short term AF in combination with heart failure" en in "non-selfterminating AF with electrical remodeling and structural remodelling". We denken dat voor een correcte opzet van de studie de time-matched controle nodig is. In antwoord op vraag 1 van appendix 2 zijn we hier uitgebreider op in gegaan. We wensen de positieve controle groep mee te nemen omdat we de mogelijk betere werking van de nieuwe drugs willen aantonen.

In appendix 2 en 3 staan de functie van de positieve en negatieve controle nu expliciet benoemd.

H. Pijn en pijnbestrijding.

3. **Vraag:** Hoe ziet u hier AF zelf? Kan dat een reden zijn voor een humaan eindpunt?

Antwoord:

Zie antwoord op vraag 3 appendix 2.

Geen aanpassing van het protocol uitgevoerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen.

4. **Vraag:** Hierin wordt gevraagd wat er gedaan wordt om het te voorkomen, hier staat meer beschreven wat er technisch gedaan wordt m.n. bij electrode failure.

Antwoord:

Het is voor ons niet geheel duidelijk wat met deze opmerking bedoeld wordt. In de appendix wordt gevraagd welke aspecten een aantasting kunnen zijn. In het document staan 5 punten opgenoemd. Infectie, uitval een geit ten gevolge een kapotte elektrode, aangepaste huisvesting, decompensatie tgv hartfalen en verminderde eetlust. Vervolgens behandelen we waarom we denken dat deze complicaties voorkomen. Tot slot worden alle vijf de punten behandeld hoe we hiermee omgaan om het risico tot een minimum te beperken. In principe zijn dit inderdaad veelal technische aanpassing maar allen dragen bij aan het beperken van het ongerief dus in onze ogen relevant om te benoemen.

Infectie → procedure aangepast om deze te voorkomen

Uitval tgv beschadigde elektrode → design en hok aangepast

Huisvesting → zo ontworpen dat de huisvesting zo veel mogelijk groepshuisvesting benaderd.

Decompenserend hartfalen → monitoring voor vroege detectie en behandeling met diuretica en verandering van de pace frequentie.
Voedselinname → exacte reden is nog onbekend. Hier gaan we systematisch verder naar kijken.

Geen aanpassing van het protocol uitgevoerd.

J. Humane eindpunten.

5. **Vraag:** Zou hier oedeem als klinisch verschijnsel niet misstaan?

Antwoord:

Oedeem vorming is inderdaad voor het hartfaalmodel een relevante complicatie. Dit is nu opgenomen in de tekst. Echter oedeem kan ook optreden ter hoogte van de operatie wand na implantatie. Hiervoor is dan ook een uitzondering gemaakt
Aangepast en in grijs gearceerd.

NTS

Opmerking: 3.3. en 3.5 lijken niet in overeenstemming qua aantallen.

Punt 3.3 is gecorrigeerd en in grijs gearceerd.

- Datum antwoord 23-11-2016
- Verstrekte antwoorden: Zie hierboven.
- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. **Eventuele adviezen door experts:** (niet lid van de DEC-UM) **N.V.T.**

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.V.T.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan.

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen.

Zie antwoord op vraag C5.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel en toegepast wetenschappelijke project dat gericht is op de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen ter behandeling van atrium fibrilleren, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep/patiënten en hun naasten, en ook de medische wetenschap en de samenleving als geheel.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Gedurende de proeven zullen de dieren gering, matig of ernstig ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over de werking en het therapeutische effect van bepaalde farmaca op atrium fibrilleren. Uiteindelijk kan meer kennis daarover leiden tot verbeterde therapeutische mogelijkheden in de cardiologie.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Meer kennis over nieuwe farmaceutische strategieën in de behandeling van atrium fibrilleren levert, behalve een beter begrip van deze aandoening, ook bouwstenen voor een verbeterde therapie.

Dat kan leiden tot vermindering van ziektelast en verbetering van levensverwachting. Hierdoor kan uiteindelijk de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Atrium fibrilleren komt nu al veel voor en zal gezien de stijgende levensverwachting steeds meer mensen treffen. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe.

De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe. **N.V.T.**
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren.

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door: De experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven. De dieren worden aan het eind van de proef opgeofferd.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe.

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord.

De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord.

Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Onderbouw uw antwoord.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC-UM reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

In onderhavige projectaanvraag worden wel dieren van een eenvormig geslacht gebruikt. Uit de projectaanvraag blijkt dat de onderzoeker zich bewust is van het nadeel van het gebruiken van dieren van een eenvormig geslacht zulks in relatie tot de vermindering van proefdieren in voorraad gedood en de onderzoeker heeft in de projectaanvraag naar de mening van de DEC-UM dit voldoende onderbouwd. Alhoewel de DEC-UM vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok

en aankoop van proefdieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Adoptie is ten aanzien van onderhavige aanvraag niet opportuun daar het hier niet handelt om niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1.

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de werking en het eventuele therapeutisch effect van bepaalde farmaca op atrium fibrilleren, de opoffering en het geringe, matige, dan wel ernstige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation?".

2.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *matig/ernstig nadeel.*

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *matig voordeel.*

Algemeen: *relevante groei van medische kennis.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na mild, matig of ernstig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren wordt geschaad door: de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en het opofferen aan het eind van de proeven. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot inzicht in de werking en het therapeutische effect van bepaalde farmaca op atrium fibrilleren. Kennis van mogelijk nieuwe farmaceutische strategieën bij de behandeling van atrium fibrilleren kan het therapeutische arsenaal in de cardiologie vergroten. Hierdoor kan uiteindelijk de levensverwachting, ziektelast en kwaliteit van leven verbeterd worden van patiënten en hun naasten.

Atrium fibrilleren komt nu al veel voor. Het risico op atrium fibrilleren stijgt met de leeftijd. Atrium fibrilleren zal gezien de stijgende levensverwachting steeds meer mensen treffen. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002016782
Bijlagen
1

Datum 2 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation." met aanvraagnummer AVD107002016782. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 1 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft op ons verzoek het in vitro proces om de componenten te selecteren meer toegelicht. Uw antwoord is toegevoegd aan het dossier en meegewogen in de besluitvorming.

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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation." starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 februari 2017 tot en met 1 februari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, vanwege de ongerief classificatie Ernstig, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 15 december 2016. 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 10 januari 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Op ons verzoek is er aanvullend advies gegeven over de chirurgie en de afwijkende huisvesting in relatie tot de ongeriefclassificatie.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:

2 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002016782

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.

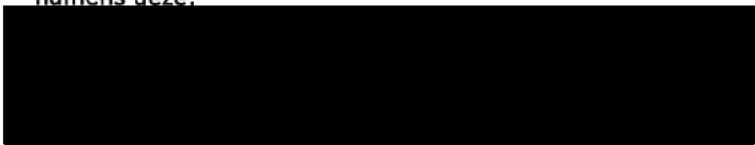
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<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:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
2 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002016782



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht

Adres: Postbus 616

Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT

Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 februari 2017 tot en met 1 februari 2022, voor het project "Development of new pharmacological strategies to treat atrial fibrillation." met aanvraagnummer AVD107002016782, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Hoofd electrofysiologie onderzoekslijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 december 2016, ontvangen op 15 december 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 1 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Pharmacokinetic studies				
	Geiten (Capra aegagrus hircus) /	24	100% Licht	
3.4.4.2 Non-selfterminating AF with only electrical remodelling				
	Geiten (Capra aegagrus hircus) /	130	100% Matig	
3.4.4.3 Effects in paroxysmal AF, permanent AF and heart failure.				
	Geiten (Capra aegagrus hircus) /	200	50% Ernstig 50% Matig	

Aanvraagnummer:

AVD107002016782

Voorwaarden

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

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 februari 2023 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 de dierproeven conform de vergunning waren.

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

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD107002016782

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD107002016782

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.

nr.	Inventaris Wob-verzoek W17-07 document NTS2016783	wordt verstrekt			deels	weigeringsgronden			11.1
		reeds openbaar	niet	geheel		10.1.c	10.2.e	10.2.g	
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Referenties			x					
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek om aanvulling aan VH 23-12-16				x		x	x	
10	Verzoek om aanvulling CCD DEC 23-12-16				x		x	x	
11	Mail reactie VH 2-1-17				x		x	x	
12	bijlage reactie DEC op vragen 23-12			x					
13	bijlage herziene dierproeven 1			x					
14	bijlage herziene dierproeven 2			x					
15	mail reactie DEC 4_1_17				x		x	x	
16	verzoek nadere aanvulling aan VH 10-1-17				x		x	x	
17	Mail reactie VH 17-1-17				x		x	x	
18	bijlage reactie DEC vragen 5-1-17			x					
19	bijlage herziene dierproeven 1 definitief			x					
20	Advies CCD		x						x
21	Beschikking				x		x	x	



20 DEC. 2016

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 / 783 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>50169181</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	50169181									
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	50169181																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg</td><td>4-6</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD</td><td>Maastricht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL04 INGB 0679 5101 68</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Universiteit Maastricht</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6	Postbus	616		Postcode en plaats	6200 MD	Maastricht	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6															
Postbus	616																
Postcode en plaats	6200 MD	Maastricht															
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(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.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(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 | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 01 - 2017 |
| Einddatum | 01 - 01 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Therapeutische maatregelen om de uitkomst van prematuren kinderen te verbeteren.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---------------------------------|
| Naam DEC | DEC-UM |
| Postadres | Postbus 616, 6200 MD Maastricht |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 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
 Referentielijst

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondertekende 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 Maastricht
 Datum 14-12-2016
 Handtekening 



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Preterm birth

Preterm birth, defined as birth before 37 weeks of gestation, is the leading cause of perinatal morbidity

and mortality in developed countries (1). Survival after preterm birth has sharply increased in the last decades (2). This positive trend can be largely contributed to reduction of early pulmonary complications, which has been established by widespread use of antepartum corticosteroids, postpartum surfactant administration and the development of improved ventilation strategies (2, 3). Unfortunately, preterm birth is still associated with mortality and long-term morbidity, despite the mentioned improvements in perinatal care. Given the magnitude of the problem of preterm birth, such a large scale health care challenge also forms a tremendous economic burden on society. The most important causes leading to preterm birth can be roughly divided in two major groups; intrauterine infection (chorioamnionitis) and fetal hypoxia-ischemia. In this project we will study the effects of chorioamnionitis.

Chorioamnionitis

Chorioamnionitis is characterized by microbial invasion of the amniotic cavity. The microorganisms responsible for this invasion, comprising *Ureaplasma urealyticum species*, most commonly originate from the lower reproductive tract (4). These microorganisms cause an inflammatory reaction of the fetal membranes (chorion and amnion), leading to release of inflammatory mediators into the amniotic fluid. As the fetus practices breathing and swallowing movements, the fetus is exposed to these microorganisms and inflammatory mediators entering both the fetal digestive tract and the lungs, causing a fetal inflammatory response syndrome (FIRS), and subsequent injury to vital organs (e.g. lungs and brain). Moreover, the inflammatory cascade triggered by chorioamnionitis (e.g. release of prostaglandins and extracellular matrix degrading proteins) leads to (medically indicated) preterm delivery (5).

As outlined above, chorioamnionitis and/or preterm birth affect vital organ systems, most importantly the respiratory (lungs), gastrointestinal (gut) and central nervous system (brain):

Lungs

Respiratory distress syndrome

When infants are born preterm, their lungs are still immature, and not capable of production of surfactant. Surfactant lowers alveolar surface tensions. As a result of absence or an inadequate amount of pulmonary surfactant a premature baby often has difficulty expanding her lungs, thereby denying proper gas exchange, often referred to as respiratory distress syndrome (RDS).

Currently, RDS is prevented by surfactant replacement therapy in which tracheal administration of exogenous surfactant (of animal origin) lowers alveolar surface tension and improves pulmonary dynamic compliance. Surfactant replacement therapy has been the most significant advance in perinatal care to decrease neonatal mortality since the late 1980's.

Yet, these biological surfactant preparations are prone to in vivo inactivation as a result of plasma proteins leaking into the airways from areas of epithelial disruption and injury, mandating development and testing of new surfactant preparations that are more resistant to inactivation (6).

CHF 5633 is a fully synthetic surfactant containing two phospholipids and two peptides analogues of human surfactant proteins B and C, designed to be resistant to inactivation (6). Sato et al. demonstrated a superior oxygenation and lung compliance in ventilated preterm lambs treated with CHF 5633 compared to other, animal-derived surfactant preparations (7). Moreover, we previously reported CHF

5633 was more resistant to *in vivo* inactivation compared to animal-derived surfactant preparations and improved oxygenation and lung function of preterm lambs that were surfactant deficient due to their prematurity (6). The only clinically approved and used surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant CHF5633 is not clinically approved. The experiments of natural surfactant represent therefore the status quo in clinical practice and serve as gold standard or benchmark for the translation of our results into clinical practice. The combination of steroids and surfactant is not recommended by the producer of surfactant.

Since (persisting antenatal) inflammation is clinically a major contributor to surfactant inactivation and RDS, we will assess an alternative approach to minimize inactivation by inflammation. We will test the suppression of the inflammatory response by administering glucocorticoids directly into the lung. We will assess the effectiveness of local administered glucocorticoids in animal-derived surfactants and in CHF5633.

Bronchopulmonary dysplasia

Antenatal exposure to inflammation accelerates lung maturation. However, by inducing accelerated early lung maturation, late lung development is impaired (8, 9). During the last phase of lung development which is called the alveolarization phase, functional alveoli are formed by secondary septation which subsequently increases the surface area needed for optimal gas exchange (10). Impairment of late lung development by intrauterine exposure to inflammation, will lead to a decreased number of alveoli and less surface area for gas exchange which eventually impairs the lung function of the newborn. This altered lung morphology can form the basis for bronchopulmonary dysplasia (BPD) (11). BPD is the most common chronic lung disease in preterm infants (12). Apart from intensive hospital care in early life, BPD infants also have an increased risk for recurrent respiratory complications such as wheezing and respiratory infections, and neurodevelopmental disabilities (13, 14). To date no effective treatment is available for BPD. Dysregulation of the pathways driving the alveolar growth by antenatal exposures could potentially result in disrupted lung morphology as seen in BPD patients.

The pathophysiological sequence leading to BPD is induced by lung immaturity combined with lung injury (15, 16). The latter is induced by inflammatory and airway remodeling processes, which are caused by **mechanical ventilation**, and/or **ante- or postnatal infections**. Especially, certain prenatal hits (namely chorioamnionitis) may prime the response of the immature lung, making it more vulnerable to postnatal hits (17, 18). This is of importance of the subsequent injuries or "hits" that the preterm lung may suffer. Mechanical ventilation is a risk factor per se for lung injury which may be aggravated by preceding injuries in a non-linear way. Two injuries are more than the addition but a potentiation of injury. Several sophisticated mechanical ventilation strategies have been clinically tested to reduce the incidence of BPD, which all failed to show improvement in clinical outcome.

Because inflammation significantly contributes to lung injury in BPD, POSTNATAL glucocorticoids have long been used as standard treatment of BPD, resulting in a reduced inflammatory response along with reduced lung damage in the preterm lungs (15, 16). But due to the risk of short- and long-term side effects, including impairment of neurological development, the routine use of SYSTEMIC POSTNATAL glucocorticoids has been drastically reduced in BPD therapy in the last years, and increased the demand for new therapeutic options for the treatment of BPD.

Still, glucocorticoids are very promising as a treatment option for BPD because of their anti-inflammatory properties and their effect on remodelling processes. At present glucocorticoids are under development which appear to be effective in treating different lung diseases like COPD and asthma. Studies in small animal models demonstrated a protective effect of glucocorticoids on BPD development through anti-inflammatory action and reversal of aberrant remodeling processes combined with prolongation of survival. However, a major challenge in a treatment using glucocorticoids is that the dose level required for therapeutic activity is about the threshold level for an induction of adverse effects. One option to reduce these systemic adverse effects could be the use of INTRATRACHEALLY administered glucocorticoids. Since BPD development is dependent on lung immaturity and lung injury caused by antenatal inflammation and postnatal ventilation, we aim to assess treatment of BPD in a preclinical animal model of BPD in which preterm ovine fetuses are exposed to antenatal inflammation (chorioamnionitis) followed by postnatal mechanical ventilation and/or glucocorticoid treatment which is further studied in locally administered and systemically administered approaches. Therefore, it is necessary to consider a trade-off between the desired effect on the lung of systemic glucocorticoids and the undesired effects on the brain.

Brain development

Chorioamnionitis and BPD have been repetitively associated with poor neurodevelopmental outcome, in particular with impaired learning skills and sensomotoric skills. The causes of the adverse outcomes are unclear, but are most likely the result of systemic inflammation which may be initiated in the lung.

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 purpose** of this research project is to improve pulmonary outcomes by developing novel approaches. The synthetic surfactant is a complete new approach with biochemically designed analogues of natural proteins without the high risk of inactivation of the natural surfactant protein. This approach is to be considered innovative since it not only improves the known beneficial effects but also prevents the known adverse effects. No surfactant has ever been recommended in combination with steroids. We are therefore in an equipoise which surfactant is best suited in the combination with glucocorticoids. We assess both and continue with the one that is best suited.

AIM 1: Identifying the effect of glucocorticoids on surfactant activity in the presence of inflammation as a cause for surfactant inactivation (hereby identifying the best of the two tested surfactant carriers for endotracheal glucocorticoids) and in combination with a synthetic surfactant (CHF5633).

AIM 2: To assess the therapeutic potentials based on pharmacological and biological effects of

intratracheal glucocorticoids in the prevention of adverse effects of prematurity.

3.3 Relevance

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

General relevance:

Preterm birth is the leading cause of perinatal morbidity and mortality in developed countries. Although survival after preterm birth has increased in the last decades, still a large proportion of preterm infants suffer from long term morbidity and disability, which have a tremendous impact on patients and their families. Preterm birth: 13649 (7,7% or 77 per 1000 live and dead born children)

Of the 13649 preterm infants, 1148 infants died in the past 5 years due to preterm birth alone or complications of preterm birth (e.g. asphyxia, respiratory insufficiency)

Extreme preterm (born below 28 weeks gestational age) : 2637 (20% of preterms) of whom 1/3 dies; 1/3 survives with handicap and 1/3/ survives without morbidity.

In 25-40% of all preterm births are caused by intra-uterine inflammation (chorioamnionitis).

Lung:

Bronchopulmonary dysplasia occurs in approximately 20% of preterm infants and is an independent risk factor for lifelong pulmonary morbidity, but also impaired neurodevelopmental outcome. Because of the greater number of survivors of prematurity, but also because of the avoidance of systemic steroid therapy for BPD due to the known side effects on the brain, the incidence of BPD as complication of preterm birth rose over the past 20 years despite the therapeutic advances in neonatology.

We will conduct relevant experiments in preclinical/translational animal models in order to improve the outcome of this highly susceptible patient group by addressing different approaches. We are therefore aiming to improve **Surfactant replacement therapy**. Surfactant is a mixture of phospholipids and proteins that decreases surface tension in the alveoli, preventing its collapse and facilitating oxygen exchange. Surfactant replacement therapy is an **absolute necessity in neonatal care**. Without surfactant, survival of preterm neonates drastically decreases.

Despite surfactant replacement therapy, preterm infants develop long term complications such as **bronchopulmonary dysplasia** (BPD), which is an irreversible simplified lung structure resulting in reduced oxygen uptake and continuous oxygen demand. BPD is the result of injury of the immature lung caused by (1) mechanical ventilation and (2) ongoing inflammation.

Glucocorticoids are potent anti-inflammatory medications which may reduce inflammation and prevent BPD. However, glucocorticoids also have an adverse effect on the brain - if they are given systemically. We want to give them intrapulmonary where we expect little adverse effects on the brain.

We want to study if prevention of BPD can be achieved by improving surfactant therapy. We will study different mechanisms:

1. Increasing resistance of surfactant to inactivation by adding glucocorticoids to surfactant will

result in maintenance of tissue oxygenation

2. the combination of a new surfactant with steroids will allow targeted therapy of the lung. Targeted therapy results in reduction of inflammation and modulates airway remodelling processes, while negative effects of glucocorticoids on the brain are avoided.

The only clinically approved and used surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant CHF5633 is not clinically approved. The experiments of natural surfactant represent therefore the status quo in clinical practice and serve as gold standard or benchmark for the translation of our results into clinical practice. Natural and synthetic surfactants differ in their composition and therefore exert different effects on the lung. Therefore, aim 1 is necessary to identify the best suitable surfactant for combination therapy with steroids. The combination of steroids and surfactant is not recommended by the producer of surfactant.

3.4 Research strategy

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

We follow a research strategy in which we use a large mammalian animal model that reflects as good as possible the clinical situation. The synthetic surfactant has been tested for example in vitro. The data did not convince the EMA. The producer did animal experiments in young dogs which the EMA did not accept as appropriate animal model for the patient population. The EMA requested therefore in vivo experiments in a preclinical model which are preterm lambs.

The large animal model allows us to mimic the different components of disease mechanism and to test innovations and treatment in a preclinical model. The sheep model has the highest track record of changing clinical care in perinatal care in clinical medicine of all animal models. Our group has already successfully tested different surfactant preparations and different modes of surfactant administration. Further did we describe interaction between glucocorticoid therapy and chorioamnionitis in our sheep model.

In the current project we have formulated two individual experimental aims to develop and improve new therapeutic strategies for the treatment of perinatal insults in well-established ovine models of intra-uterine inflammation and mechanical ventilation.

Advantages of the sheep model

Ovine fetal development, in terms of lung alveolarization and white matter development, is comparable to human fetal development: both processes start prenatally and continue postnatally, whereas these processes start postnatally in rodents (figure 1).

Moreover, the size of the ovine fetus allows for chronic *in utero* instrumentation (hypoxia-ischemia model) and allows the use of ventilation equipment and ventilation strategies currently used in clinical practice.

Furthermore, the long gestational period (~147 days) allows for more precise timing of perinatal insults based on specific developmental processes for most organs.

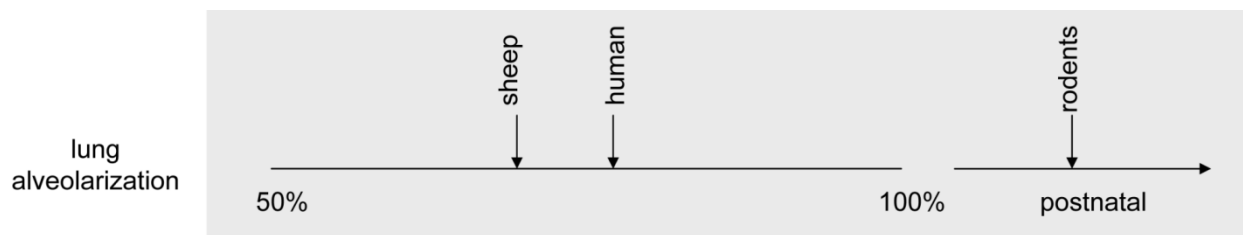


Figure 1 Lung development during gestation in humans, sheep and rodents.

We will focus on two aims. In aim 1, we will identify the effect of glucocorticoids on surfactant activity in the presence of inflammation as a cause for surfactant inactivation (hereby identifying the best of the two tested surfactant carriers for endotracheal glucocorticoids) and in combination with a synthetic surfactant (CHF5633). In aim 2, we assess the therapeutic potentials based on pharmacological and biological effects of intratracheal glucocorticoids in the prevention of adverse effects of prematurity.

The combination of steroids and surfactant is not recommended by the producer of surfactant. The only clinically approved and used surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant CHF5633 is not clinically approved. The experiments of natural surfactant represent therefore the status quo in clinical practice and serve as gold standard or benchmark for the translation of our results into clinical practice.

1. **Intra-uterine inflammation:** What surfactant preparation plus glucocorticoids is the least susceptible to *in vivo* inactivation induced by antenatal inflammation (chorioamnionitis) and mechanical ventilation?

Persistent (antenatal) inflammation is a major contributor to inactivation of biological surfactant preparations and subsequent RDS in preterm infants and therefore the inactivation of new surfactant preparations cannot be tested in healthy animals. Synthetic surfactant has proven superiority in terms of resistance to inactivation when compared to biological preparations, due to altered peptide structures that cannot be destroyed by proteases. However, *in vivo* inactivation of synthetic surfactant in the presence and absence of glucocorticoids has not been tested in a clinical relevant model of chorioamnionitis-induced preterm birth.

2. **Ventilation-induced lung injury:** Is inhibition of inflammation and modulation of pulmonary developmental pathways by locally applied glucocorticoids effective in reducing bronchopulmonary dysplasia caused by chorioamnionitis and mechanical ventilation?

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.

Intra-uterine inflammation: Time-mated Texel ewes receive an intra-amniotic injection of *Ureaplasma Parvum* (UP). UP is the most clinically relevant pathogen with respect to chorioamnionitis (35). Seven days after inoculation with UP the fetus is delivered preterm and subjected to mechanical ventilation and is subsequently treated with different surfactant preparations. The primary outcomes of this study are oxygenation (arterial oxygen partial pressure), repetitive dosing depending on oxygenation, and activity

of surfactant recovered from the animals after sacrifice.

The only clinically approved and used surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant CHF5633 is not clinically approved. The experiments of natural surfactant represent therefore the status quo in clinical practice and serve as gold standard or benchmark for the translation of our results into clinical practice. A previous version of the synthetic surfactant has been tested successfully in the absence of glucocorticoids.

Ventilation-induced lung injury

In order to model chronic lung disease, we combine intrauterine inflammation and postnatal mechanical ventilation, which are major contributors to BPD in preterms (15, 16). Time-mated Texel ewes receive an intra-amniotic injection of UP. Seven days after inoculation with UP the fetus is delivered preterm and subjected to long-term mechanical ventilation and subsequent treatment with glucocorticosteroids systemically or endotracheally.

Primary outcome parameter is survival, with BPD being a major cause of mortality in preterm infants. Secondary outcome parameters include lung inflammation, lung compliance, lung development and lung injury. These parameters indicate how development of lung changes associated with BPD are affected by the therapeutic intervention.

The brains will be collected and scanned in a MRI analysis. Subsequent histologic analyses are based on the results of the scan.

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.

Survival and adult health start *in utero* with a successful transition from *in utero* life to postnatal life. Our project comprises different complications in this transition. The coherence between the different components of our project lies in the fact that we focus on the biggest threats for impaired development in prematurity, namely infection (i.e. chorioamnionitis) and iatrogenic stressors (i.e. mechanical ventilation) which all result in inflammation of the airways of the newborn. The objective of this project is to develop therapeutic strategies to reduce the consequences of these threats and improve outcome in preterm infants.

The second point of coherence between the different components in this project is the effect of anti-inflammatory drugs which bear a high therapeutic potential, but also the potential of adverse effects. It has been tested *in vitro*. The data did not convince the EMA. The producer did animal experiments in young dogs which the EMA did not accept as appropriate animal model for the patient population. The EMA requested therefore *in vivo* experiments in a preclinical model.

The project includes:

AIM 1: Identifying a surfactant replacement therapy resistant to inactivation by inflammation/infection would mean a pivotal milestone in neonatal medicine solving a problem which neonatologists face on a daily basis. The end of the experiment for aim 1 will serve as a milestone (proof of principle) and as a go

or no go: if the combination of synthetic surfactant and local glucocorticosteroids does not prove to be superior over natural surfactants, we will not pursue further experimentation, this including experiments under aim 2 with this surfactant. The surfactant alone has already successfully been tested beforehand.

AIM 2: Reducing BPD using a synthetic anti-inflammatory drug would be a significant milestone in neonatal medicine creating the opportunity to reduce the pulmonary and neurodevelopmental sequelae of BPD in preterm infants. The end of the experiment for aim 1 will serve as a milestone (proof of principle) and as a go or no go: proof of principle that local glucocorticoids attenuates inflammation- and ventilation-induced lung injury will be a major milestone and will serve as the basis for further experimentation and future clinical trials. The group with systemic glucocorticoids serve as benchmark to validate the effectiveness of the locally applied glucocorticoids.

Go or no go's and milestones

The end of the experiment for aim 1 will serve as a milestone (proof of principle) and as a go or no go: if the combination of synthetic surfactant and glucocorticosteroids does not prove to be superior over natural surfactant plus glucocorticosteroids, we will not pursue further experimentation with this synthetic surfactant in combination with glucocorticoids as described in aim 2. Therefore, the experiments are intertwined.

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	Intra-uterine inflammation
2	Ventilation-induced lung injury
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Intra-uterine inflammation

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We induce intra-uterine inflammation with intra-amniotic injections of Ureaplasma Parvum (UP), since this micro-organism is the most commonly found micro-organism in human chorioamnionitis cases. Previous studies already validated this approach and the same amount of colony forming units will be administered in the current study. The presence of chorioamnionitis can only be confirmed after birth which will be done by histological examination of the fetal membranes and placenta. The fetuses are delivered preterm by C-section, sedated and mechanically ventilated for 48 hours during which they are treated with different surfactant preparations. Subsequently, animals receive ventilator support via CPAP for 5 days. We have formulated the following 6 experimental groups:

1. Control ventilation
2. UP + Control ventilation
3. UP + natural surfactant (Curosurf, clinical standard, porcine origin)
4. UP + CHF5633 (synthetic surfactant)
5. UP + natural surfactant (Curosurf) + glucocorticoid (Budesonide 0,25 mg/kg)
6. UP + CHF5633+ glucocorticoid (Budesonide 0,25 mg/kg)

Groups 1, 3 and 4 are necessary to assess the effects in the pattern of clinical practice. Group 1 will help to identify the inflammatory phenotype influencing treatment effect, group 3 is current clinical standard and group 4 will help to identify if the artificial surfactant itself has an effect on inflammation due to its different protein composition.

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism. Based on a power calculation, and taking into account a loss of 25% in total of the animals due to complications of intra-uterine inflammation (10%), premature birth (5%) and humane endpoints in lambs (10%) we calculated a total number of animals per experimental groups will which be 12.

Within these experimental groups the following primary and outcome parameters will be assessed:

Primary outcomes:

- Oxygenation (arterial oxygen partial pressure) in the course of ventilation: oxygenation is the main clinical parameter indicative for adequate ventilation)
- Repetitive dosing: depending on oxygenation: due to inactivation of surfactant, oxygenation might fail and additional boluses of surfactant are needed.
- Activity of surfactant recovered from the animals after sacrifice

The animals get colostrum and breast milk from sheep during the mechanical ventilation according to a feeding protocol from the neonatal intensive care unit with gastric tube feeding.

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

Time-mated Texel ewes will receive an intra-amniotic injection of *Ureaplasma Parvum* (UP):

Under sedation UP is administered by ultrasound-guided intra-amniotic injection. 2 days before preterm delivery, the ewes will be given an intramuscular injection of dexamethasone, which enhances fetal lung maturation and allows the fetus to be ventilated postnatally. Moreover, maternal intramuscular dexamethasone administration mimics the clinical standard nowadays.

Maternal administration should not be confused with postnatal steroid treatment in the fetus for BPD: Prenatal treatment of the mother is beneficial for the child because lung maturation is induced and mortality is decreased.

Postnatal treatment of the preterm infant has also been shown to positively influence the infants' lung, and BPD is decreased. However, corticosteroids given systemically to the infant have serious side effects on the neurodevelopmental outcome. Therefore, postnatal therapy can only be administered after balancing the positive effects on the lung and the negative effects on the brain, leading frequently to a therapeutic dilemma.

Administration of corticosteroids for longer periods of time induces abortion in sheep. However, a single

injection of dexamethasone, as administered in our proposed experiments, will not increase the risk of abortion (Fehrholz et al., Am. J. Physiology 2015) provided that the fetus will be born 48 hours after injection.

Previous experiments with intra-uterine Ureaplasma Parvum infection and treatment with dexamethasone demonstrated that dexamethasone 2 days prior to delivery did not have any effects on the immune response towards Ureaplasma Parvum

Seven days after the inoculation with UP, the fetus will be born preterm by **C-section** (general anesthesia): while remaining on placental circulation umbilical vessel catheters are placed for administration of medication (i.e. **anesthesia**) and blood gas analysis and an endotracheal tube is placed for ventilatory support (modified EXIT procedure). The lamb is immediately placed in our lamb intensive care unit which resembles the clinical intensive care very closely. Before connection to mechanical ventilation the lambs receive **surfactant replacement therapy** (according to their allocation). The lamb remains mechanically ventilated for 24 hours while **anesthesia** is maintained. Surfactant replacement therapy is repeated throughout the experiment if necessary. After 24 h the animals will be switched to continuous positive pressure ventilation for additional 6 days under sedation.

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

We have a preference for singleton pregnancies since this is more clinical relevant and twins can strongly affect each other's health (i.e. resulting in small for gestational age) however, to reduce the number of pregnant ewes we will use both singleton and twin pregnancies. Furthermore, we do not know in advance whether it will be a single or twin pregnancy and only selecting twin pregnancies will result in massive over-breeding. Group numbers were determined with the power-calculation according to Sachs, in which variance and expected therapeutic effects are based on previous experiments with surfactant in non-infectious sheep models.

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism

In ventilated preterm sheep (non-infectious model, Seehase et al., 2012) CHF5633 has shown a comparable effect on oxygenation but superior resistance against inactivation. Surfactant re-dosing in a 48-hour period of ventilation is the critical outcome in this experiment.

B. The animals

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

Lambs are the most appropriate animals to address our hypothesis, for a number of reasons:

1. Development of the lungs in sheep has been sufficiently studied to allow informed experimental design and integration of findings with those from previous studies. The current surfactant replacement therapy was developed in preterm lambs.

2. Preterm lambs are large enough to use similar equipment for ventilation as in the neonatal intensive care unit, provide sufficient blood and tissue to allow enough biomolecular analyses, for thorough assessment of the biological systems being investigated, in individuals.

The total number of animals needed for the current study will be 6 groups * 12 animals = 72 animals. We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism. Based on a power calculation, and taking into account a loss of 25% in total of the animals due to complications of intra-uterine inflammation (10%), premature birth (5%) and humane endpoints in lambs (10%) we calculated a total number of animals per experimental groups will be 12.

We cannot predict the number of twin pregnancies, since multiple factors (e.g. seasonal vs. out of season breeding and the age of the ewe) are of influence. Therefore, the number of ewes is based on singleton pregnancies. In the case of twin pregnancy, the total number of ewes used for the experiment will be reduced.

The gestational age at which the lambs are delivered (129-132d gestational age) is based on the developmental biology in which the sheep is very similar to a preterm infant (figure 1). In contrast to rodents, ovine lung development (alveolarization) starts prenatally and is prolonged postnatally. Moreover, the size allows for usage of similar equipment and ventilation strategies as is currently used in clinical practice. Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate in utero growth.

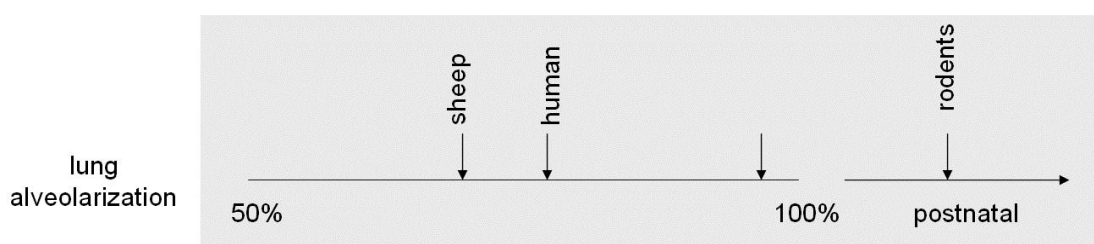


Figure 1 Time-points are shown when lung alveolarization, an important hallmark of lung maturation, occurs in different species. Lung maturation in sheep occurs prenatally, as in humans. Lung maturation in rodents takes place after birth.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The use of preterm lambs has been suggested by the European Medical Agency (EMA) to pharmaceutical companies. We have done studies with synthetic surfactant (Seehase et al., 2012) which were mandated by the EMA in order to show in vivo the safety and feasibility of the new drug. It is unacceptable to test directly in human babies based on exclusively in vitro data by the standards of EMA and by good clinical practice since preterm babies is the most vulnerable patient population. In addition neonatology is full of examples of premature clinical trials with caused harm in the study population (e.g. phospholipid treatment for RDS).

Reduction: Due to large experience with sheep and maintenance of lambs on the lamb intensive care unit we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise of our team, we have low numbers of drop-outs which decreased over the years with increasing experience, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. These methods are in favor of reproducibility and use of previously obtained historical data (also on CHF 5633 inactivation (2)) and prevent unnecessary use and loss of animals. Moreover, we do not differentiate between genders since our clinical population consists of both sexes.

Furthermore, we are able to incorporate twin pregnancies in our study. This results in a reduction of pregnant ewes that will be used. We rely on natural breeding. Therefore, we cannot control for singleton or twin pregnancies.

Refinement:

For this experiment in which different surfactant preparations are tested, the choice of animal model is based on the body size, use of similar equipment as in the neonatal intensive care and the developmental biology. In contrast to rodents, ovine and human the developmental biology are very similar. For example, the alveolar phase in lambs and humans starts before birth in a hypoxic environment, compared to rodents in which the alveolarization starts postnatally in normoxic conditions. Therefore, we have established an animal model of immature lung-development in preterm lambs. Findings in our animal model can be easily translated into clinical practice. Our staff and the staff of the animal care facility have been trained by a Texel sheep breeder to recognize symptoms of pending labor and give assistance to the sheep upon labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment (group housing in a meadow) as we can with minimal human contact. Moreover, the fetus will receive analgesia and nutritional support (glucose) during mechanical ventilation.

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

on the environment.

Ewe

Before induction of intra-uterine inflammation the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water *ad libitum*. After induction of intra-uterine inflammation the sheep are housed in groups with access to food and water *ad libitum*.

The sheep will be checked daily for discomfort due to intra-uterine inflammation. Discomfort due to intra-uterine inflammation is described in the humane endpoint section. Post-operative (after intra-amniotic injection) antibiotics, if necessary, will be administered, in order to prevent progression of (wound) infection.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).

The majority of the animals have been exposed to Ureaplasma. Therefore, re-use is not possible. All ewes will be euthanized after the c-section.

Fetus

Previous experiments have demonstrated that fetal cortisol levels do not change in the course of chorioamnionitis (Jobe et al, Am J Respir Crit Care Med. 2000 Nov;162(5):1656-61). This suggests that the fetus will experience limited discomfort during intra-uterine inflammation in our experiments.

Chorioamnionitis is a multi-organ disease resulting in discomfort after birth, as they need to survive independently and start using their immature and inflammation affected organs. However, after C-section (birth) the fetus will stay on the Lamb Intensive Care Unit (LICU) and taken care of by highly trained personnel. During mechanical ventilation the fetus is constantly sedated (also receiving analgesia and parenteral feeding) with continuous monitoring and interpretation of vital parameters. Moreover, the environment in the LICU (temperature, light, sound) will be kept optimal in order to reduce discomfort.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

This experiment is new and is not a repetition. The previous in vitro work is used to reduced the number of animals by avoiding a dose finding study.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Ewe: All surgical procedures are performed under anesthesia (including analgetic block).

Lamb: whilst on placental circulation, the lamb is sedated through anesthesia of the ewe. Ex utero experiments are performed under sedation guided by depth of sedation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Ewe:

Abortion might occur due to chorioamnionitis, but is very uncommon in sheep (8) (in retrospect over the past 10 years: 5 in 100). This is a major reason to use this species.

Fetus:

The fetus might experience pain, suffer from hemodynamic instability or respiratory complications (pneumothorax, hypoxia) or hypoglycemia.

Explain why these effects may emerge.

Due to their immaturity preterm fetuses are not always able to respond properly to environmental changes. The fetus might experience pain, suffer from hemodynamic instability or respiratory complications (pneumothorax, hypoxia).

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

Ewe:

All invasive procedures are performed under aseptic conditions.

The ewe will not recover from anesthesia.

Fetus:

The fetus will be sedated continuously after birth to minimise discomfort, also receiving analgesia. Environmental conditions (light, temperature, sounds) on the LICU are all in favour of the fetus.

Continuous monitoring of hemodynamic and respiratory enables us to treat or prevent the complications. Intravenous administration of glucose will prevent hypoglycemia (regularly checked)

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 for ewes:

- Pending preterm labor
- Intra-uterine fetal death
- Sepsis/ infection not responding to treatment
 - o **Local (at the site of intra-amniotic injection):** redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
 - o **Systemic:** Fever, lethargy, excessive time lying down
- Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)

Humane endpoints for fetus:

- Untreatable pneumothorax
- Uncorrectable severe respiratory acidosis
- Sepsis Uncorrectable hypovolemia
- Multi-organ failure

Indicate the likely incidence.

Ewe: 5%

Fetus: 10%

K. Classification of severity of procedures

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

Ewe: Moderate

Lamb: Non-recovery. During the mechanical ventilation, the lambs are continuously anesthetized (sedation and analgesia), and will not regain conscience, until the end of the experiment (euthanasia). Therefore, we consider the classification of the experiment to be non-recovery.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The ewe will be euthanized since we cannot reuse her for other purposes due to an intra-uterine infection and abdominal surgery.

The lamb will be euthanized since vital organs (i.e. lungs) have to be sampled for biochemical analysis.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10700	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		2	Ventilation-induced lung injury

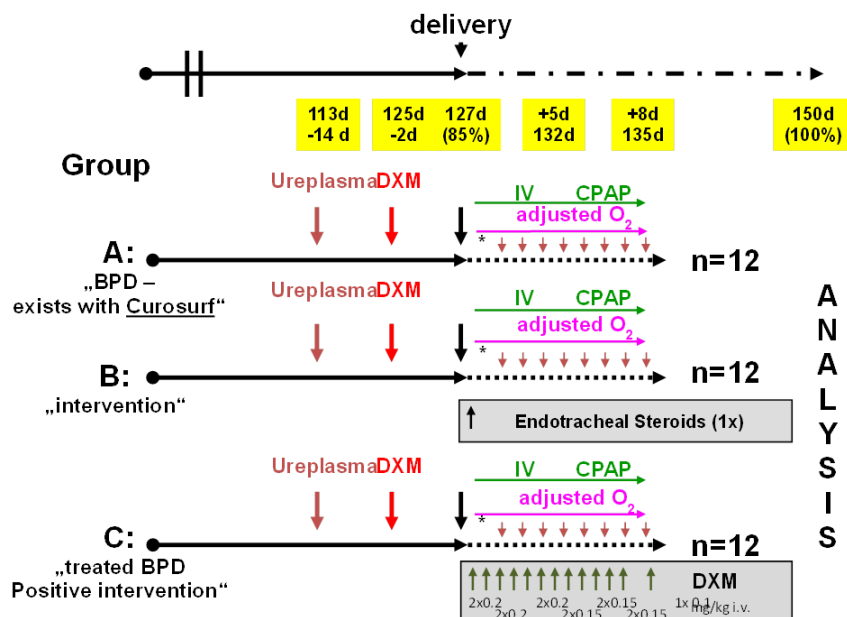
Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We induce intra-uterine inflammation with intra-amniotic injections of *Ureaplasma Parvum*, since this micro-organism is the most commonly found micro-organism in human chorioamnionitis cases. Previous studies already validated this approach and the same amount of colony forming units will be administered in the current study. The presence of chorioamnionitis can only be confirmed after birth which will be done by histological examination of the fetal membranes and placenta. The fetuses are delivered preterm by C-section (127d), sedated and mechanically ventilated for a maximum of 8 days in order to develop (histological) BPD [1]. During mechanical ventilation the lambs are treated with a glucocorticoid either by local instillation with surfactant or systemically. We compare endotracheal treatment (B) with intravenous treatment (C), a third group serves as control (A, see figure 1). A fourth group (D) will not be ventilated, but delivered on the same gestational age that autopsy is performed in the other three groups (127d+8d=135d). This group is used to identify the effects of chorioamnionitis with/without dexamethasone on lung inflammation, lung compliance, lung development and lung injury in comparison to mechanically ventilated animals (Figure 1). The following primary and secondary outcome parameters will assess feasibility, safety and efficacy of a topical administered glucocorticoids:



D: phenotype: lambs delivered at 135 d n=12

- D1 after DXM and ureaplasma; N=8
- D2 without any intervention; N=4

Figure 1 Experimental design: (Brown arrow: intra amniotic injection of UP, red arrow i.m. injection of dexamethason to mother; black arrow: delivery; small downward arrows: surfactant replacement therapy, * indicates that surfactant redosing does not follow a fixed scheme but is done dependent on oxygenation index; small upward arrows: corticosteroids to lamb.)

Primary outcome parameters: Survival. Both intrauterine inflammation and preterm birth are major risk factors for neonatal death due to complications that arise from underdeveloped organ systems. BPD is recognized as major factor in mortality in preterm infants. Treatment might improve survival compared to controls.

Secondary outcome parameters: Lung inflammation, lung compliance, lung development and lung injury, brain injury, brain development.

Lambs are the most appropriate animals to address our hypothesis, for a number of reasons:

1. Development of the lungs in sheep has been sufficiently studied to allow informed experimental design and integration of findings with those from previous studies. The current surfactant replacement therapy was developed in preterm lambs.
2. Preterm lambs are large enough to use similar equipment for ventilation as in the neonatal intensive care unit, provide sufficient blood and tissue to allow enough biomolecular analyses, for thorough assessment of the biological systems being investigated, in individuals.

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

UP is administered by ultrasound-guided intra-amniotic injection. 2 days before preterm delivery, the ewes will be given an intramuscular injection of dexamethasone, which enhances fetal lung maturation and allows the fetus to be ventilated postnatally. Moreover, maternal intramuscular dexamethasone administration mimics the clinical standard nowadays.

Fourteen days after the inoculation with UP, the fetus will be born preterm by **C-section** (general anesthesia): while remaining on placental circulation umbilical vessel catheters are placed for administration of medication (i.e. anesthesia) and blood gas analysis and an endotracheal tube is placed for ventilatory support (modified EXIT procedure). The lamb is immediately placed in our lamb intensive care unit which resembles the clinical intensive care very closely. Before connection to mechanical ventilation the lambs receive surfactant replacement therapy which is repeated if necessary (based on oxygenation). The lambs remain under ventilatory support for **3 days** while **anesthesia** is maintained and subsequently on respiratory support with CPAP (continuous positive airway pressure). Animals are maximum 8 days in the experiment. During these days, repetitive doses of glucocorticoids or sham treatment will be administered endotracheally or i.v. (Figure 1).

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

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism. Based on a power calculation, and taking into account a loss of 25% in total of the animals due to complications of intra-uterine inflammation (10%), premature birth (5%) and humane endpoints in lambs (10%) we calculated a total number of animals per experimental groups will which be **12**. The total number of animals needed for the current study will by 4 groups * 12 animals = **48 animals**.

We cannot predict the number of twin pregnancies, since multiple factors (e.g. seasonal vs. out of season breeding and the age of the ewe) are of influence. Therefore, the number of ewes is based on singleton pregnancies. In the case of twin pregnancy, the total number of ewes used for the experiment will be reduced.

B. The animals

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

The total number of animals needed for the current study will by 4 groups * 12 animals = 48 animals.

We will deliver 36 animals at **127d** (group A-C). Animals will receive receive ventilation and ventilator support for 8 days, therefore autopsy will also be performed on **day 135**. (figure 1). In group D, N=8 lambs are delivered at **135 d** after DXM and ureaplasma and N=4 without any intervention to assess the lung changes (lung inflammation, lung compliance, lung development and lung injury) due to chorioamnionitis and due to the immaturity at birth.

The other are intubated upon delivery.

Lambs are the most appropriate animals to address our hypothesis, for a number of reasons:

1. Development of the lungs in sheep has been sufficiently studied to allow informed experimental design and integration of findings with those from previous studies. The current surfactant replacement therapy was developed in preterm lambs.
2. Preterm lambs are large enough to use similar equipment for ventilation as in the neonatal intensive care unit, provide sufficient blood and tissue to allow enough biomolecular analyses, for thorough assessment of the biological systems being investigated, in individuals.

This experiment will be performed with a maximum of 48 pregnant sheep (Texel breed) and their respective singleton or twin fetuses (> 2/3 gestation, max. 48 fetuses) that are randomly allocated into 4 experimental groups consisting of 3 different glucocorticoid regimes, and one control group (cf. Appendix 1). If there are twin pregnancies less pregnant ewes will be needed. The gestational age at which the lambs in the ventilation groups are delivered (127d gestational age) is based on the developmental biology in which the sheep is very similar to a preterm infant (figure 2). In contrast to rodents, ovine lung development (alveolarization) starts prenatally and is prolonged postnatally. Moreover, the size allows for usage of similar equipment and ventilation strategies as is currently used in clinical practice. Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate in utero growth.

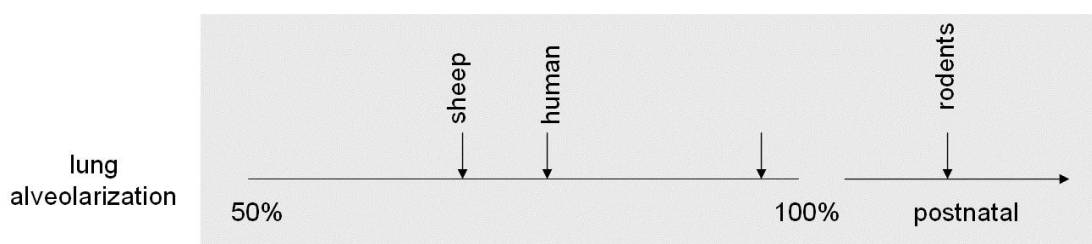


Figure 2 Time-points are shown when lung alveolarization, an important hallmark of lung maturation, occurs in different species. Lung maturation in sheep occurs prenatally, as in humans. Lung maturation in rodents takes place after birth.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The use of preterm lambs has been suggested by the European Medical Agency (EMA)

to pharmaceutical companies. We have done studies with synthetic surfactant (Seehase et al., 2012) with were mandated by the EMA in order to show in vivo the safety and feasibility of the new drug. It is unacceptable to test directly in human babies based on exclusively in vitro data by the standards of EMA and by good clinical practice since preterm babies is the most vulnerable patient population. In addition neonatology is full of examples of premature clinical trials with caused harm in the study population (e.g. phospholipid treatment for RDS).

Reduction: The groups A and B of this appendix are identical to the corresponding groups of Appendix 1. Once the experiments of Appendix 1 have identified which surfactant is superior we intend to use the animals from Appendix 1 for the purposes of Appendix 2 in order to reduce the number of animals.

Further, due to large experience with sheep and maintenance of lambs on the lamb intensive care unit we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise and experience of our team we have low numbers of drop-outs, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. These methods are in favor of reproducibility and use of previously obtained historical data and prevent unnecessary use and loss of animals. Moreover, we do not differentiate between genders since our clinical population consists of both sexes.

Furthermore, we are able to incorporate twin pregnancies in our study. This results in a reduction of pregnant ewes that will be used.

A variety of glucocorticoids have been tested in vitro and in vivo. In our current model we will use dosages defined on this pre-existing data.

Refinement: For this innovative technique of endotracheal administration of glucocorticoids to the preterm lung, the choice of animal model is based on the body size, use of similar equipment as in the neonatal intensive care and the developmental biology. In contrast to rodents, ovine and human the developmental biology are very similar (figure 2). For example, the alveolar phase in lambs and humans starts before birth in a hypoxic environment, compared to rodents in which the alveolarization starts postnatally in normoxic conditions. Therefore, we have established an animal model of immature lung-development in preterm lambs. Findings in our animal model can be easily translated into clinical practice. Our experiments will be conducted by a highly trained staff that can recognize and prevent discomfort. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment (group housing in a meadow) as we can with minimal human contact.

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

Ewe

Before induction of intra-uterine inflammation and the C-section the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water *ad libitum*. After induction of intra-uterine inflammation the sheep will be housed in groups with access to food and water *ad libitum*.

The sheep will be checked daily for discomfort due to intra-uterine inflammation. Discomfort due to intra-uterine inflammation is described in the human endpoint section. If necessary, analgesics are administered to treat pain.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up

the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling). The UP exposure does not result in pain, distress or sepsis.

Fetus

During intrauterine inflammation fetuses will not experience distress as demonstrated by no changes of fetal cortisol levels during chorioamnionitis [7].

Chorioamnionitis is a multi-organ disease resulting in discomfort after birth, as they need to survive independently and start using their immature and inflammation affected organs. However, after C-section (birth) the fetus will stay on the Lamb Intensive Care Unit (LICU) and taken care of by highly trained personnel. During mechanical ventilation the fetus is constantly sedated (also receiving analgesia and parenteral feeding) with continuous monitoring and interpretation of vital parameters. Moreover, the environment in the LICU (temperature, light, sound) will be kept optimal in order to reduce discomfort.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

This experiment is new and is not a repetition. The previous in vitro work is used to reduced the number of animals by avoiding a dose finding study.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Ewe: anesthesia during operation, local analgesia of surgical wounds.

Lamb: whilst on placental circulation, the lamb is sedated through anesthesia of the ewe. Ex utero experiments are performed under sedation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Ewe:

Abortion might occur due to chorioamnionitis, but is very uncommon in sheep [8]. This is a major reason to use this species.

Fetus:

The fetus will be sedated continuously after birth to minimise discomfort, also receiving analgesia.

Environmental conditions (light, temperature, sounds) on the LICU are all in favour of the fetus.

Explain why these effects may emerge.

Due to their immaturity preterm fetuses are not always able to respond properly to environmental changes.

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

Ewe:

All invasive procedures are performed under aseptic conditions.

The ewe will not recover from anesthesia.

The majority of the animals have been exposed to Ureaplasma. Therefore, re-use is not possible. All ewes will be euthanized after the c-section.

Fetus:

Environmental conditions (light, temperature, sounds) on the LICU are all in favour of the fetus. Pain will be prevented by continuous anesthesia. Continuous monitoring of hemodynamic and respiratory enables us to treat or prevent the complications. Intravenous administration of glucose will prevent hypoglycemia (regularly checked)

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 for ewes:

- Pending preterm labor
- Abortion caused by intra-uterine fetal death
- Sepsis/ infection not responding to treatment
 - o **Local (at site of injection):** redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be

- o treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
- o **Systemic:** Fever, lethargy, excessive time lying down
- Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)
 - o **Assessment of pain:**
 - Lack of appetite
 - Grinding of teeth
 - Reluctance to stand/ excessive time lying down
 - Lethargy/depression: an unresponsive sheep with hung head and dull eyes can indicate pain, illness or discomfort

Humane endpoints for lambs:

- Untreatable pneumothorax (absence of breath sounds)
 - Uncorrectable severe respiratory acidosis(based on blood gas analysis)
 - Sepsis (elevation of body temperature, elevation heart rate, blood gas analysis)
 - Uncorrectable hypovolemia (blood pressure, heart rate, blood gas analysis)
- Multi-organ failure (blood-pressure, heart rate, blood gas analysis)

Indicate the likely incidence.

Ewe: 5%

Fetus: 10%

K. Classification of severity of procedures

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

Ewe: moderate

Lamb:Non-recovery. During the mechanical ventilation, the lambs are continuously sedated and will not regain conscience, until the end of the experiment (euthanasia).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The fetus will be euthanized at the end of the experiment since examination of organ tissues is crucial to determine the effects of our treatment(s).

The ewes will be euthanized since we cannot reuse her for other purposes due to an intra-uterine infection an abdominal surgery.

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

Proposal

- [1] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84.
- [2] Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet*. 2008;371(9608):261-9.
- [3] Doyle LW, Faber B, Callanan C, Freezer N, Ford GW, Davis NM. Bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight subjects and lung function in late adolescence. *Pediatrics*. 2006;118(1):108-13.
- [4] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *The New England journal of medicine*. 2000;342(20):1500-7.
- [5] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*. 2000;342(20):1500-7.
- [6] Seehase M, Collins JJ, Kuypers E, Jellema RK, Ophelders DR, Ospina OL, et al. New surfactant with SP-B and C analogs gives survival benefit after inactivation in preterm lambs. *PLoS One*. 2012;7(10):e47631.
- [7] Sato A, Ikegami M. SP-B and SP-C containing new synthetic surfactant for treatment of extremely immature lamb lung. *PLoS One*. 2012;7(7):e39392.
- [8] Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and development. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006;91(2):F132-5.
- [9] Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics*. 1996;97(2):210-5.
- [10] Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate*. 2006;89(4):313-22.
- [11] Bancalari E, Claire N, Sosenko IR. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol*. 2003;8(1):63-71.
- [12] Farstad T, Bratlid D, Medbo S, Markestad T. Bronchopulmonary dysplasia - prevalence, severity and predictive factors in a national cohort of extremely premature infants. *Acta Paediatr*. 2011;100(1):53-8.
- [13] Kobaly K, Schluchter M, Minich N, Friedman H, Taylor HG, Wilson-Costello D, et al. Outcomes of extremely low birth weight (<1 kg) and extremely low gestational age (<28 weeks) infants

- with bronchopulmonary dysplasia: effects of practice changes in 2000 to 2003. *Pediatrics*. 2008;121(1):73-81.
- [14] Short EJ, Klein NK, Lewis BA, Fulton S, Eisengart S, Kercksmar C, et al. Cognitive and academic consequences of bronchopulmonary dysplasia and very low birth weight: 8-year-old outcomes. *Pediatrics*. 2003;112(5):e359.
- [15] Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet*. 2006;367(9520):1421-31.
- [16] Speer CP. Chorioamnionitis, postnatal factors and proinflammatory response in the pathogenetic sequence of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology*. 2009;95(4):353-61.
- [17] Kunzmann S, Collins JJ, Kuypers E, Kramer BW. Thrown off balance: the effect of antenatal inflammation on the developing lung and immune system. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208(6):429-37.
- [18] Kunzmann S, Collins JJ, Kuypers E, Gavilanes AW, Kramer BW. [Effects of antenatal inflammation on the developing lung]. *Z Geburtshilfe Neonatol*. 2012;216(4):177-85.
- [19] Soto FJ, Hanania NA. Selective phosphodiesterase-4 inhibitors in chronic obstructive lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2005;11(2):129-34.
- [20] de Visser YP, Walther FJ, Laghmani el H, Steendijk P, Middeldorp M, van der Laarse A, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition attenuates persistent heart and lung injury by neonatal hyperoxia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(1):L56-67.
- [21] de Visser YP, Walther FJ, Laghmani EH, van Wijngaarden S, Nieuwland K, Wagenaar GT. Phosphodiesterase-4 inhibition attenuates pulmonary inflammation in neonatal lung injury. *Eur Respir J*. 2008;31(3):633-44.
- [22] Mehats C, Franco-Montoya ML, Boucherat O, Lopez E, Schmitz T, Zana E, et al. Effects of phosphodiesterase 4 inhibition on alveolarization and hyperoxia toxicity in newborn rats. *PLoS One*. 2008;3(10):e3445.
- [23] Mehats C, Bourbon J, Jarreau PH. Does PDE4 inhibition improve alveolarisation in hyperoxia-exposed immature rodents? *Eur Respir J*. 2009;33(5):1236; author reply 7.
- [24] Tenor H, Hatzelmann A, Beume R, Lahu G, Zech K, Bethke TD. Pharmacology, clinical efficacy, and tolerability of phosphodiesterase-4 inhibitors: impact of human pharmacokinetics. *Handb Exp Pharmacol*. 2011(204):85-119.

- [25] Singh D, Petavy F, Macdonald AJ, Lazaar AL, O'Connor BJ. The inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 reduces allergen challenge responses in asthma. *Respir Res.* 2010;11:26.
- [26] Watz H, Mistry SJ, Lazaar AL. Safety and tolerability of the inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 in moderate COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26(5):588-95.
- [27] Gortner L, Felderhoff-Muser U, Monz D, Bieback K, Kluter H, Jellema R, et al. Regenerative therapies in neonatology: clinical perspectives. *Klin Padiatr.* 2012;224(4):233-40.
- [28] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(10):2566-73.
- [29] Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):383-96.
- [30] Jellema RK, Wolfs TG, Lima Passos V, Zwanenburg A, Ophelders DR, Kuypers E, et al. Mesenchymal stem cells induce T-cell tolerance and protect the preterm brain after global hypoxia-ischemia. *PLoS One.* 2013;8(8):e73031.
- [31] Jellema RK, Lima Passos V, Ophelders DR, Wolfs TG, Zwanenburg A, De Munter S, et al. Systemic G-CSF attenuates cerebral inflammation and hypomyelination but does not reduce seizure burden in preterm sheep exposed to global hypoxia-ischemia. *Exp Neurol.* 2013;250:293-303.
- [32] Jellema RK, Lima Passos V, Zwanenburg A, Ophelders DR, De Munter S, Vanderlocht J, et al. Cerebral inflammation and mobilization of the peripheral immune system following global hypoxia-ischemia in preterm sheep. *J Neuroinflammation.* 2013;10:13.
- [33] Berseth CL, McCoy HH. Birth asphyxia alters neonatal intestinal motility in term neonates. *Pediatrics.* 1992;90(5):669-73.
- [34] Fox TP, Godavitarne C. What really causes necrotising enterocolitis? *ISRN gastroenterology.* 2012;2012.
- [35] Berger A, Witt A, Haiden N, Kretzer V, Heinze G, Kohlhauser C. Microbial invasion of the amniotic cavity at birth is associated with adverse short-term outcome of preterm infants. *J Perinat Med.* 2003;31(2):115-21.
- [36] Back SA, Riddle A, Dean J, Hohimer AR. The instrumented fetal sheep as a model of cerebral white matter injury in the premature infant. *Neurotherapeutics.* 2012;9(2):359-70.

Appendix 1

- [1] Seehase M, Collins JJ, Kuypers E, Jellema RK, Ophelders DR, Ospina OL, et al. New surfactant with SP-B and C analogs gives survival benefit after inactivation in preterm lambs. *PLoS One*. 2012;7:e47631.
- [2] Nitsos I, Moss TJ, Cock ML, Harding R, Newnham JP. Fetal responses to intra-amniotic endotoxin in sheep. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002;9:80-5.

Appendix 2

- [1] Albertine KH. Utility of large-animal models of BPD: chronically ventilated preterm lambs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015;308:L983-L1001.
- [2] Tenor H, Hatzelmann A, Beume R, Lahu G, Zech K, Bethke TD. Pharmacology, clinical efficacy, and tolerability of phosphodiesterase-4 inhibitors: impact of human pharmacokinetics. *Handb Exp Pharmacol*. 2011:85-119.
- [3] Tralau-Stewart CJ, Williamson RA, Nials AT, Gascoigne M, Dawson J, Hart GJ, et al. GSK256066, an exceptionally high-affinity and selective inhibitor of phosphodiesterase 4 suitable for administration by inhalation: in vitro, kinetic, and in vivo characterization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011;337:145-54.
- [4] Nials AT, Tralau-Stewart CJ, Gascoigne MH, Ball DI, Ranshaw LE, Knowles RG. In vivo characterization of GSK256066, a high-affinity inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011;337:137-44.
- [5] Singh D, Petavy F, Macdonald AJ, Lazaar AL, O'Connor BJ. The inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 reduces allergen challenge responses in asthma. *Respir Res*. 2010;11:26.
- [6] Watz H, Mistry SJ, Lazaar AL. Safety and tolerability of the inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 in moderate COPD. *Pulm Pharmacol Ther*. 2013;26:588-95.
- [7] Nitsos I, Moss TJ, Cock ML, Harding R, Newnham JP. Fetal responses to intra-amniotic endotoxin in sheep. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002;9:80-5.
- [8] Shorten PR, O'Connell AR, Demmers KJ, Edwards SJ, Cullen NG, Juengel JL. Effect of age, weight, and sire on embryo and fetal survival in sheep. *J Anim Sci*. 2013;91:4641-53.

DEC-advies PV 2016-012/ [REDACTED]

Preambule:

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis.*
3. **Titel van de NTS:** *Therapeutische maatregelen om de uitkomst van premature kinderen te verbeteren.*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC; *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon; [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon; [REDACTED]
6. **Adviestraject:** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC-UM; 03-11-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken; 11-11-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. **Afstemming IvD:**
 - De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD *dd. 03-11-2016.*
8. **Eventueel horen van aanvrager:** **N.V.T.**
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum 16-11-2016
 -

Gestelde vragen en antwoorden:

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Vragen:

1. **De DEC-UM waardeert de prima geschetste achtergrond van dit PV. De DEC-UM vraagt wel nog om een paragraaf om de bijwerkingen op neurologische ontwikkelingen aan te geven.**

Antwoord:

Chorioamnionitis and BPD have been repetitively associated with poor neurodevelopmental outcome, in particular with impaired learning skills and sensomotoric skills. The causes of the adverse outcomes are unclear, but are most likely the result of systemic inflammation which may be initiated in the lung.

2. **Het is niet duidelijk waarom nog moeite gedaan dient te worden om dier-gerelateerde surfactant in combinatie met glucocorticoids te onderzoeken als het synthetische surfactant CHF5633 superieure effecten vertoont?**

Antwoord:

The only clinically approved and used surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant CHF5633 is not clinically approved. The experiments of natural surfactant represent therefore the status quo in clinical practice and serve as gold standard or benchmark for the translation of our results into clinical practice. The combination of steroids and surfactant is not recommended by the producer of surfactant.

3.2 Doel

Vragen:

1. **De DEC-UM vraagt zich af of de twee te testen doelstellingen geclassificeerd moeten worden als “novel” of eerder als “verbetering” van bestaande therapieën. In de achtergrond wordt ook geen kader geschetst voor nieuwe behandeling strategieën.**

Antwoord:

The main purpose of this research project is to improve pulmonary outcomes by developing novel approaches. The synthetic surfactant is a complete new approach with biochemically designed analogues of natural proteins without the high risk of inactivation of the natural surfactant protein. This approach is to be considered innovative since it not only improves the known beneficial effects but also prevents the known adverse effects.

2. **De DEC-UM vraagt zich af hoe in aim 1 de bijwerkingen voor neurologische ontwikkeling worden voorkomen aangezien dit een van de problemen is bij deze behandeling.**

Antwoord:

The kinetics of glucocorticoid adverse events are increased in the presence of systemic inflammation which is induced by mechanical ventilation. The various surfactant preparations have different effects in the presence of inflammation which allows the comparison even in the “back ground noise” of adverse effects on neurodevelopment.

3. **Aim 1 met dier-gerelateerde surfactant lijkt de DEC-UM weinig zinvol als er een superieur synthetisch surfactant bestaat.**

Antwoord:

The only clinically approved and used surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant CHF5633 is not clinically approved. The experiments of natural surfactant represent therefore the status quo in clinical practice and serve as gold standard or benchmark for the translation of our results into clinical practice. The combination of steroids and surfactant is not recommended by the producer of surfactant.

4. **Wordt het therapeutisch potentieel enkel uitgezocht in combinatie met CHF5633? Zie ook relevantie kopje (... combination of the new surfactant with steroids...).**

Antwoord:

No, we clarified this part. We are in an equipoise which surfactant is best suited in the combination with glucocorticoids. We assess both and continue with the one that is best suited.

3.3. Belang

Vragen:

1. **De DEC-UM vraagt zich ook hier af waarom glucocorticoids worden gebruikt om inactivatie van surfactant te voorkomen maar niet wordt aangegeven wat wordt gedaan om de bijwerkingen op bijvoorbeeld neurologische ontwikkeling te voorkomen.**

Dit wordt pas in aim 2 aangehaald.

Antwoord:

Glucocorticoids are potent anti-inflammatory medications which may reduce inflammation and prevent BPD. However, glucocorticoids also have an adverse effect on the brain - if they are given systemically. We want to give them intrapulmonary where we expect little adverse effects on the brain.

2. **De DEC-UM vraagt de onderzoekers het verschil tussen aims 1 en 2 beter aan te geven, omdat het nu lijkt dat aim 1 overbodig is als er in aim 2 gezocht wordt naar nieuwe surfactant behandeling in combinatie met glucocorticoids en hierin ook wordt getracht de negatieve bijwerkingen te reduceren.**

Antwoord:

Correct, however the only clinically approved and used surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant CHF5633 is not clinically approved. The experiments of natural surfactant represent therefore the status quo in clinical practice and serve as gold standard or benchmark for the translation of our results into clinical practice. Natural and synthetic surfactants differ in their composition and therefore exert different effects on the lung. Therefore, aim 1 is necessary to identify the best suitable surfactant for combination therapy with steroids. The combination of steroids and surfactant is not recommended by the producer of surfactant.

3. **Voor welk gebied gelden de gepresenteerde cijfers, o.a. 13649 vroeg-geborenen, voor Nederland?**

Antwoord:

Yes.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1

Vragen:

1. **De DEC-UM vraagt zich af of de experimentele opzet onder aim 1 niet uitgevoerd kan worden *in vitro* en of –en waarom – het noodzakelijk is dit in een pre-klinisch model te testen.**

Antwoord:

The synthetic surfactant has been tested *in vitro*. The data did not convince the EMA. The producer did animal experiments in young dogs which the EMA did not accept as appropriate animal model for the patient population. The EMA requested therefore *in vivo* experiments in a preclinical model which are preterm lambs.

2. **Het is duidelijk om de noodzaak van *in vivo* inactivation van synthetische surfactant te testen in aan/afwezigheid van glycocorticoids. Waarom dient dier-gerelateerde surfactant nog meegenomen te worden?**

Antwoord:

The only clinically approved and used surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant CHF5633 is not clinically approved. The experiments of natural surfactant represent therefore the status quo in clinical practice and serve as gold standard or benchmark for the translation of our results into clinical practice. The combination of steroids and surfactant is not recommended by the producer of surfactant.

3. **De DEC-UM vraagt zich onder aim 1 af welke surfactant al succesvol is getest? Is dit de synthetische variant vergeleken met de natuurlijke? En wordt dit in de kliniek al toegepast?**

Antwoord:

The only clinically approved and used surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant CHF5633 is not clinically approved. The experiments of natural surfactant represent therefore the status quo in clinical practice and serve as gold standard or benchmark for the translation of our results into clinical practice. A previous version of the synthetic surfactant has been tested successfully in the absence of glucocorticoids.

3.4.2

Vragen:

1. **De DEC-UM vraagt zich af of er geen hersen/neurologisch onderzoek wordt verricht?**

Antwoord:

The brains will be collected and scanned in a MRI analysis. Subsequent histologic analyses are based on the results of the scan.

2. **Waarin verschillen long-term ventilation (ventilation-induced lung injury) met ventilation (intra-uterine inflammation) qua tijdsduur aangezien ventilation in beide gebeurt?**

Antwoord:

This is our mistake: in appendix 1 we have 1 day of mechanical ventilation and 6 days of CPAP. In appendix 2 mechanical ventilation is increased to 3 days in order to reflect the clinical situation. The overall time of ventilation/animal experimentation remains the same in appendices 1 and 2.

3.4.3

Vragen:

1. **De DEC-UM vraagt zich onder aim 1 af welke surfactant al succesvol is getest? Is dit de synthetische variant vergeleken met de natuurlijke?**

Antwoord:

A previous version of the synthetic surfactant has been tested successfully in the absence of glucocorticoids.

2. **De DEC-UM vraagt zich af of de combinatie van synthetisch surfactant en glucocorticoid behandeling niet *in vitro* getest kan worden. Verder vraagt de DEC-UM zich af of niet alles onder aim 2 uitgevoerd kan worden?**

Antwoord:

It has been tested in vitro. The data did not convince the EMA. The producer did animal experiments in young dogs which the EMA did not accept as appropriate animal model for the patient population. The EMA requested therefore in vivo experiments in a preclinical model.

3.4.4

Appendix 1

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. **Het doel van deze aim is het testen of synthetisch surfactant in combinatie met glucocorticoid, stabiliteit vertoond t.o.v. natuurlijk surfactant. Is het daarom noodzakelijk om groepen 1, 3, en 4 uit te voeren? Dit is geen onderdeel van deze vraagstelling.**

Antwoord:

Groups 1, 3 and 4 are necessary to assess the effects in the pattern of clinical practice. Group 1 will help to identify the inflammatory phenotype influencing treatment effect, group 3 is current clinical standard and group 4 will help to identify if the artificial surfactant itself has an effect on inflammation due to its different protein composition.

2. **Zijn groep 3 en 5 noodzakelijk indien men al weet dat er een superieur synthetisch surfactant bestaat?**

Antwoord:

Yes. The combination of steroids and surfactant is not recommended by the producer of surfactant.

3. **Worden de lammetjes gevoed tijdens 6 dagen anesthesie? Zo niet, hoe beïnvloedt dit de outcome? Hoe wordt outcome beïnvloed door 6 dagen anesthesie?**

Antwoord:

The animals get colostrum and breast milk from sheep during the mechanical ventilation according to a feeding protocol from the neonatal intensive care unit with gastric tube feeding.

4. **Wat gebeurt er met de moeders na de keizersnede?**

Antwoord:

The majority of the animals have been exposed to Ureaplasma. Therefore, re-use is not possible. All ewes will be euthanized after the c-section.

5. **Voor het berekenen van het aantal proefdieren nodig per groep, kan dit exact gebeuren (op basis van vorige experimenten) met een uitvalsberekening? Het aantal dieren in B gaat reeds uit van 12 per groep.**

Antwoord:

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism. Based on a power calculation, and taking into account a loss of 25% in total of the animals due to complications of intra-uterine inflammation (10%), premature birth (5%) and humane endpoints in lambs (10%) we calculated a total number of animals per experimental groups will which be 12.

6. **De DEC-UM vraagt zich onder aim 1 af welke surfactant al succesvol is getest? Is dit de synthetische variant vergeleken met de natuurlijke? En wordt dit in de kliniek al toegepast?**

Antwoord:

The only clinically approved and used surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant CHF5633 is not clinically approved. The experiments of natural surfactant represent therefore the status quo in clinical practice and serve as gold standard or benchmark for the translation of our results into clinical practice. A previous version of the synthetic surfactant has been tested successfully in the absence of glucocorticoids.

B. De dieren.

7. **Is er iets bekend over uitval? Gaarne toelichten.**

Antwoord:

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism. Based on a power calculation, and taking into account a loss of 25% in total of the animals due to complications of intra-uterine inflammation (10%), premature birth (5%) and humane endpoints in lambs (10%) we calculated a total number of animals per experimental groups will which be 12.

D.

Vervanging, vermindering en verfijning.

8. **De DEC-UM vraagt zich af of hier geen *in vitro* experiment op zijn plaats is.**

Antwoord:

It has been tested *in vitro*. The data did not convince the EMA. The producer did animal experiments in young dogs which the EMA did not accept as appropriate animal model for the patient population. The EMA requested therefore *in vivo* experiments in a preclinical model.

9. **In appendix 1 wordt superieure surfactant bepaald, maar overal wordt vermeld dat het superieure surfactant de synthetische is. Hoe leidt dit tot vermindering van het aantal dieren als beide opnieuw getest worden?**

Antwoord:

It has been tested *in vitro*. The data did not convince the EMA. The producer did animal experiments in young dogs which the EMA did not accept as appropriate animal model for the patient population. The EMA requested therefore *in vivo* experiments in a preclinical model.

E. Herhaling.

10. **Niet beantwoord?**

Antwoord:

This experiment is new and is not a repetition. The previous *in vitro* work is used to reduced the number of animals by avoiding a dose finding study.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen.

11. **De DEC-UM merkt op dat hier voor de eerste keer aangegeven wordt dat het schaap niet uit de narcose bijkomt.**

Antwoord:

The majority of the animals have been exposed to Ureaplasma. Therefore, re-use is not possible. All ewes will be euthanized after the c-section.

See above

Appendix 2

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. **De DEC-UM vraagt zich af of er geen neurologische analyses/ hersen analyses uitgevoerd worden om de nadelige effecten van glucocorticoid behandeling te testen.**

Antwoord:

We added these analyses.

D.

Vervanging, vermindering en verfijning.

2. **Kan men voor groep D meer pijn verwachten ten gevolge van de UP behandeling en het langer moeten leven met infectie, die dus steeds sterker wordt?**

Antwoord:

No. Ureaplasma infections have not been associated with sepsis, pain and distress.

E. Herhaling.

3. **Niet ingevuld?**

Antwoord:

This experiment is new and is not a repetition. The previous in vitro work is used to reduced the number of animals by avoiding a dose finding study.

- Datum antwoord 24-11-2016
- Verstreckte antwoorden: **Zie hierboven.**
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. **Eventuele adviezen door experts:** (niet lid van de DEC-UM) **N.V.T.**

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.V.T.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan.

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen.

Zie antwoord op vraag C5.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel en toegepast wetenschappelijke project, dat gericht is op het verbeteren van de behandeling van vroeg-geborenen door nieuwe strategieën te testen voor de verbetering van hun pulmonaire functie, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep, d.w.z. de pasgeborenen en hun naasten, en ook de medische wetenschap en de samenleving als geheel.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen ongerief ondervinden dat voor de ooiën wordt geclassificeerd als matig en voor de lammeren als non-recovery.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over mogelijke methoden om longproblemen bij vroeg geboren te verhelpen. Uiteindelijk kan deze kennis leiden tot verbeterde therapeutische mogelijkheden in de neonatologie.

Waarden die voor de patiënten c.q. de vroeg geboren bevorderd worden: Verbeterde therapie en vergrote levensverwachting. Daardoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Vroeggeboorte is een voorname oorzaak van perinatale ziektelast en sterfte. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe.

De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe. **N.V.T.**
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren.

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door: De experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven. De dieren worden aan het eind van de proef opgeofferd.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe.

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord.

De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord.

Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Onderbouw uw antwoord.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC-UM reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

In onderhavige projectaanvraag worden wel dieren van een eenvormig geslacht gebruikt. Uit de projectaanvraag blijkt dat de onderzoeker zich bewust is van het nadeel van het gebruiken van dieren van een eenvormig geslacht zulks in relatie tot de vermindering van proefdieren in voorraad gedood en de onderzoeker heeft in de projectaanvraag naar de mening van de DEC-UM dit voldoende onderbouwd.

Alhoewel de DEC-UM vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Adoptie is ten aanzien van onderhavige aanvraag niet opportuun.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over nieuwe strategieën ter verbetering van de pulmonaire functie van vroeg geboren en de opoffering en het matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis?".

- 2.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *matig nadeel.*

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Algemeen: *relevante groei van medische kennis.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiëntjes en hun naasten in het bijzonder, binnen het project "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na, voor de ooien, matig ongerief. Het ongerief voor de lammeren wordt gekwalificeerd als non-recovery. De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot kennis over nieuwe methoden om de longfunctie van vroeg geboren en te verbeteren. In de neonatologische kliniek is op dit punt behoefte aan meer kennis en effectievere therapie. Hierdoor kan de levensverwachting, de ziektelast en uiteindelijk ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiëntjes en hun naasten.

Vroeggeboorte is een belangrijke oorzaak van perinatale morbiditeit en sterfte. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3.

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over nieuwe strategieën ter verbetering van de pulmonaire functie van vroeg geboren en, de opoffering en het matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis?" bevestigend.

Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis metabolism" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis" van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X De DEC-UM adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is **unaniem** tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project.

N.v.t. Daarenboven is de DEC-UM niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.

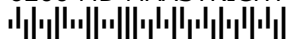


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002016783

Bijlagen

2

Datum 15 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 december 2016. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002016783. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

15 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD107002016783

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
15 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD107002016783

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2017
Geplande einddatum: 1 januari 2022
Titel project: Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis
Titel niet-technische samenvatting: Therapeutische maatregelen om de uitkomst van prematuren kinderen te verbeteren.
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD Maastricht
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Maastricht
Datum: 14 december 2016

Datum:
15 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD107002016783



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002016783

Bijlagen

2

Datum 15 december 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 15 december 2016

Vervaldatum: 14 januari 2017

Factuurnummer: 16700783

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002016783	€ 1.187,00

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

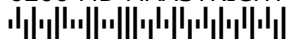


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002016783

Datum 23 december 2016

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 15 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis" met aanvraagnummer AVD107002016783. 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

- 1) In uw aanvraag motiveert u de noodzaak om dit onderzoek uit te voeren door te melden dat de EMA naar het testen van de synthetische surfactant in lammetjes heeft gevraagd. Indien zo, zou dit project niet onder 'wettelijk vereist' onderzoek moeten vallen? Is het mogelijk om een officiële verzoek van de EMA naar ons toe te sturen? Indien niet, dan verzoeken we u om de reden dit al eerder uitgevoerd onderzoek in schapen te herhalen nader te onderbouwen.
- 2) In de aanvraag geeft u aan dat het ongerief van de lammetjes in de categorie terminaal valt, omdat de dieren vanaf de keizersnede onder verdoving worden gehouden. Daarnaast schrijft u onder punt I dat de foetussen pijn zouden kunnen ervaren, aan hemodynamische instabiliteit, respiratorische complicaties of hypoglycaemie zouden kunnen leiden. Bedoelt u dat dit gebeurt alleen als de dieren niet onder verdoving zijn of kunnen de lammetjes ook onder verdoving pijn ervaren?

3) In uw NTS geeft u aan 120 ooien en 120 lammetjes voor dit onderzoek te willen gebruiken, maar in de bijlages dierproeven zijn deze aantallen niet duidelijk aangegeven. In bijlage 1 is alleen het aantal lammetjes benoemd. We verzoeken u het aantal benodigde dieren duidelijker in de bijlages dierproeven te melden.

Datum:
23 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD107002016783

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



Melding bijlagen

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

Naam instelling: Universiteit Maastricht

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD107002016783

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

23 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD107002016783

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

[Redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 23 december 2016 15:36
Aan: [Redacted]
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD107002016783

Geachte DEC-UM,

Enige tijd geleden heeft u advies uitgebracht op een projectaanvraag met titel "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis" met aanvraagnummer AVD107002016783.

De volgende vragen zijn aan de aanvrager voorgelegd:

1) In uw aanvraag motiveert u de noodzaak om dit onderzoek uit te voeren door te melden dat de EMA naar het testen van de synthetische surfactant in lammetjes heeft gevraagd. Indien zo, zou dit project niet onder 'wettelijk vereist' onderzoek moeten vallen? Is het mogelijk om een officiële verzoek van de EMA naar ons toe te sturen? Indien niet, dan verzoeken we u om de reden dit al eerder uitgevoerd onderzoek in schapen te herhalen nader te onderbouwen.

2) In de aanvraag geeft u aan dat het ongerief van de lammetjes in de categorie terminaal valt, omdat de dieren vanaf de keizersnede onder verdoving worden gehouden. Daarnaast schrijft u onder punt I dat de foetussen pijn zouden kunnen ervaren, aan hemodynamische instabiliteit, respiratorische complicaties of hypoglycaemie zouden kunnen leiden. Bedoelt u dat dit gebeurt alleen als de dieren niet onder verdoving zijn of kunnen de lammetjes ook onder verdoving pijn ervaren?

3) In uw NTS geeft u aan 120 oaien en 120 lammetjes voor dit onderzoek te willen gebruiken, maar in de bijlages dierproeven zijn deze aantallen niet duidelijk aangegeven. In bijlage 1 is alleen het aantal lammetjes benoemd. We verzoeken u het aantal benodigde dieren duidelijker in de bijlages dierproeven te melden.

We zouden graag de mening van de DEC willen horen over de categorie van dit project. Heeft de DEC een mogelijk wettelijk vereist karakter van dit project overwogen?

Het is niet duidelijk aangegeven in het advies of de DEC met de inschatting van het ongerief die in de aanvraag is ingevuld het eens is. Valt het ongerief van de lammetjes onder terminaal of onder een andere categorie?

We ontvangen graag uw reactie uiterlijk donderdag 5 januari 2017, om deze mee te kunnen nemen in de eerstvolgende CCD vergadering.

Alvast hartelijk dank.
Fijne feestdagen en Gelukkig Nieuwjaar!

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

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 2 januari 2017 12:30
Aan: Info-zbo; [REDACTED]
Onderwerp: Re: aanvullende informatie aanvraag AVD107002016783
Bijlagen: Project DEC CCD.docx; PV 2016-012 Appendix 1 - description animal procedure - Intra-uterine inflammation_revised.docx; PV 2016-012 Appendix 2 - description animal procedure - Ventilation-induced lung injury_revised.docx

Project "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis" met aanvraagnummer AVD107002016783

Reply to questions from 23.12.2016

1) In uw aanvraag motiveert u de noodzaak om dit onderzoek uit te voeren door te melden dat de EMA naar het testen van de synthetische surfactant in lammetjes heeft gevraagd. Indien zo, zou dit project niet onder 'wettelijk vereist' onderzoek moeten vallen? Is het mogelijk om een officiële verzoek van de EMA naar ons toe te sturen? Indien niet, dan verzoeken we u om de reden dit al eerder uitgevoerd onderzoek in schapen te herhalen nader te onderbouwen.

The EMA has requested the producer of the surfactant to test the synthetic surfactant who has contracted us to do so. The legislation of "wettelijk vereist onderzoek" is therefore not applicable.

The synthetic surfactant is a drug under development and not yet licensed. Batch to batch variability still exists. The company has requested - based on EMAs suggestions - to include the control group with the current synthetic surfactant batch to have a control group in order to reproduce the effect of the drug in the current experiment and not from a historic control respectively batch.

2) In de aanvraag geeft u aan dat het ongerief van de lammetjes in de categorie terminaal valt, omdat de dieren vanaf de keizersnede onder verdoving worden gehouden. Daarnaast schrijft u onder punt I dat de foetussen pijn zouden kunnen ervaren, aan hemodynamische instabiliteit, respiratorische complicaties of hypoglycaemie zouden kunnen leiden. Bedoelt u dat dit gebeurt alleen als de dieren niet onder verdoving zijn of kunnen de lammetjes ook onder verdoving pijn ervaren?

Please accept our apologies for the imprecision. We meant that animals WITHOUT sedation can suffer pain but NOT if they are sedated.

3) In uw NTS geeft u aan 120 oaien en 120 lammetjes voor dit onderzoek te willen gebruiken, maar in de bijlages dierproeven zijn deze aantallen niet duidelijk aangegeven. In bijlage 1 is alleen het aantal lammetjes benoemd. We verzoeken u het aantal benodigde dieren duidelijker in de bijlages dierproeven te melden.

We have clarified the appendices. We need 120 animals.

Appendix 1: per group N=12 animals/lambs, 6x 12= 72 animals/lambs

Appendix 2: As shown in figure 1: four groups of N=12 animals/lambs per group
4 x 12 = 48 animals/lambs for appendix 2

Total: 72 + 48 animals = 120 animals/lambs = 120 ewes

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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|----------------------------|
| 1 | Intra-uterine inflammation |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We induce intra-uterine inflammation with intra-amniotic injections of Ureaplasma Parvum (UP), since this micro-organism is the most commonly found micro-organism in human chorioamnionitis cases. Previous studies already validated this approach and the same amount of colony forming units will be administered in the current study. The presence of chorioamnionitis can only be confirmed after birth which will be done by histological examination of the fetal membranes and placenta. The fetuses are delivered preterm by C-section, sedated and mechanically ventilated for 48 hours during which they are treated with different surfactant preparations. Subsequently, animals receive ventilator support via CPAP for 5 days. We have formulated the following 6 experimental groups:

1. Control ventilation N=12
2. UP + Control ventilation N=12
3. UP + natural surfactant (Curosurf, clinical standard, porcine origin) N=12
4. UP + CHF5633 (synthetic surfactant) N=12
5. UP + natural surfactant (Curosurf) + glucocorticoid (Budesonide 0,25 mg/kg) N=12
6. UP + CHF5633+ glucocorticoid (Budesonide 0,25 mg/kg) N=12

Groups 1, 3 and 4 are necessary to assess the effects in the pattern of clinical practice. Group 1 will help to identify the inflammatory phenotype influencing treatment effect, group 3 is current clinical standard and group 4 will help to identify if the artificial surfactant itself has an effect on inflammation due to its different protein composition.

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism. Based on a power calculation, and taking into account a loss of 25% in total of the animals due to complications of intra-uterine inflammation (10%), premature birth (5%) and humane endpoints in lambs (10%) we calculated a total number of animals per experimental groups will which be 12.

Within these experimental groups the following primary and outcome parameters will be assessed:

Primary outcomes:

- Oxygenation (arterial oxygen partial pressure) in the course of ventilation: oxygenation is the main clinical parameter indicative for adequate ventilation)
- Repetitive dosing: depending on oxygenation: due to inactivation of surfactant, oxygenation might fail and additional boluses of surfactant are needed.
- Activity of surfactant recovered from the animals after sacrifice

The animals get colostrum and breast milk from sheep during the mechanical ventilation according to a feeding protocol from the neonatal intensive care unit with gastric tube feeding.

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

Time-mated Texel ewes will receive an intra-amniotic injection of *Ureaplasma Parvum* (UP):

Under sedation UP is administered by ultrasound-guided intra-amniotic injection. 2 days before preterm delivery, the ewes will be given an intramuscular injection of dexamethasone, which enhances fetal lung maturation and allows the fetus to be ventilated postnatally. Moreover, maternal intramuscular dexamethasone administration mimics the clinical standard nowadays.

Maternal administration should not be confused with postnatal steroid treatment in the fetus for BPD: Prenatal treatment of the mother is beneficial for the child because lung maturation is induced and mortality is decreased.

Postnatal treatment of the preterm infant has also been shown to positively influence the infants' lung, and BPD is decreased. However, corticosteroids given systemically to the infant have serious side effects on the neurodevelopmental outcome. Therefore, postnatal therapy can only be administered after balancing the positive effects on the lung and the negative effects on the brain, leading frequently to a therapeutic dilemma.

Administration of corticosteroids for longer periods of time induces abortion in sheep. However, a single

injection of dexamethasone, as administered in our proposed experiments, will not increase the risk of abortion (Fehrholz et al., Am. J. Physiology 2015) provided that the fetus will be born 48 hours after injection.

Previous experiments with intra-uterine Ureaplasma Parvum infection and treatment with dexamethasone demonstrated that dexamethasone 2 days prior to delivery did not have any effects on the immune response towards Ureaplasma Parvum

Seven days after the inoculation with UP, the fetus will be born preterm by **C-section** (general anesthesia): while remaining on placental circulation umbilical vessel catheters are placed for administration of medication (i.e. **anesthesia**) and blood gas analysis and an endotracheal tube is placed for ventilatory support (modified EXIT procedure). The lamb is immediately placed in our lamb intensive care unit which resembles the clinical intensive care very closely. Before connection to mechanical ventilation the lambs receive **surfactant replacement therapy** (according to their allocation). The lamb remains mechanically ventilated for 24 hours while **anesthesia** is maintained. Surfactant replacement therapy is repeated throughout the experiment if necessary. After 24 h the animals will be switched to continuous positive pressure ventilation for additional 6 days under sedation.

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

We have a preference for singleton pregnancies since this is more clinical relevant and twins can strongly affect each other's health (i.e. resulting in small for gestational age) however, to reduce the number of pregnant ewes we will use both singleton and twin pregnancies. Furthermore, we do not know in advance whether it will be a single or twin pregnancy and only selecting twin pregnancies will result in massive over-breeding. Group numbers were determined with the power-calculation according to Sachs, in which variance and expected therapeutic effects are based on previous experiments with surfactant in non-infectious sheep models.

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism

In ventilated preterm sheep (non-infectious model, Seehase et al., 2012) CHF5633 has shown a comparable effect on oxygenation but superior resistance against inactivation. Surfactant **re-dosing** in a 48-hour period of ventilation is the **critical outcome** in this experiment.

B. The animals

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

Lambs are the most appropriate animals to address our hypothesis, for a number of reasons:

1. Development of the lungs in sheep has been sufficiently studied to allow informed experimental design and integration of findings with those from previous studies. The current surfactant replacement therapy was developed in preterm lambs.

2. Preterm lambs are large enough to use similar equipment for ventilation as in the neonatal intensive care unit, provide sufficient blood and tissue to allow enough biomolecular analyses, for thorough assessment of the biological systems being investigated, in individuals.

The total number of animals needed for the current study will be 6 groups * 12 animals = 72 animals. We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism. Based on a power calculation, and taking into account a loss of 25% in total of the animals due to complications of intra-uterine inflammation (10%), premature birth (5%) and humane endpoints in lambs (10%) we calculated a total number of animals per experimental groups will be 12.

We cannot predict the number of twin pregnancies, since multiple factors (e.g. seasonal vs. out of season breeding and the age of the ewe) are of influence. Therefore, the number of ewes is based on singleton pregnancies. In the case of twin pregnancy, the total number of ewes used for the experiment will be reduced.

The gestational age at which the lambs are delivered (129-132d gestational age) is based on the developmental biology in which the sheep is very similar to a preterm infant (figure 1). In contrast to rodents, ovine lung development (alveolarization) starts prenatally and is prolonged postnatally. Moreover, the size allows for usage of similar equipment and ventilation strategies as is currently used in clinical practice. Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate in utero growth.

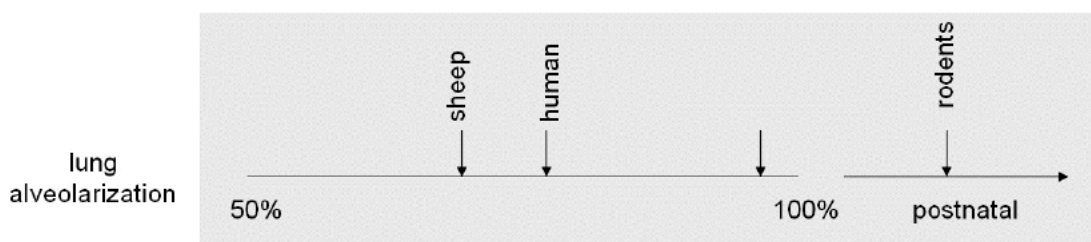


Figure 1 Time-points are shown when lung alveolarization, an important hallmark of lung maturation, occurs in different species. Lung maturation in sheep occurs prenatally, as in humans. Lung maturation in rodents takes place after birth.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The use of preterm lambs has been suggested by the European Medical Agency (EMA) to pharmaceutical companies. We have done studies with synthetic surfactant (Seehase et al., 2012) with were mandated by the EMA in order to show in vivo the safety and feasibility of the new drug. It is unacceptable to test directly in human babies based on exclusively in vitro data by the standards of EMA and by good clinical practice since preterm babies is the most vulnerable patient population. In addition neonatology is full of examples of premature clinical trials with caused harm in the study population (e.g. phospholipid treatment for RDS).

Reduction: Due to large experience with sheep and maintenance of lambs on the lamb intensive care unit we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise of our team, we have low numbers of drop-outs which decreased over the years with increasing experience, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. These methods are in favor of reproducibility and use of previously obtained historical data (also on CHF 5633 inactivation (2)) and prevent unnecessary use and loss of animals. Moreover, we do not differentiate between genders since our clinical population consists of both sexes. Furthermore, we are able to incorporate twin pregnancies in our study. This results in a reduction of pregnant ewes that will be used. We rely on natural breeding. Therefore, we cannot control for singleton or twin pregnancies.

Refinement:

For this experiment in which different surfactant preparations are tested, the choice of animal model is based on the body size, use of similar equipment as in the neonatal intensive care and the developmental biology. In contrast to rodents, ovine and human the developmental biology are very similar. For example, the alveolar phase in lambs and humans starts before birth in a hypoxic environment, compared to rodents in which the alveolarization starts postnatally in normoxic conditions. Therefore, we have established an animal model of immature lung-development in preterm lambs. Findings in our animal model can be easily translated into clinical practice. Our staff and the staff of the animal care facility have been trained by a Texel sheep breeder to recognize symptoms of pending labor and give assistance to the sheep upon labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment (group housing in a meadow) as we can with minimal human contact. Moreover, the fetus will receive analgesia and nutritional support (glucose) during mechanical ventilation.

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

on the environment.

Ewe

Before induction of intra-uterine inflammation the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water *ad libitum*. After induction of intra-uterine inflammation the sheep are housed in groups with access to food and water *ad libitum*.

The sheep will be checked daily for discomfort due to intra-uterine inflammation. Discomfort due to intra-uterine inflammation is described in the humane endpoint section. Post-operative (after intra-amniotic injection) antibiotics, if necessary, will be administered, in order to prevent progression of (wound) infection.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).

The majority of the animals have been exposed to Ureaplasma. Therefore, re-use is not possible. All ewes will be euthanized after the c-section.

Fetus

Previous experiments have demonstrated that fetal cortisol levels do not change in the course of chorioamnionitis (Jobe et al, Am J Respir Crit Care Med. 2000 Nov;162(5):1656-61). This suggests that the fetus will experience limited discomfort during intra-uterine inflammation in our experiments.

Chorioamnionitis is a multi-organ disease resulting in discomfort after birth, as they need to survive independently and start using their immature and inflammation affected organs. However, after C-section (birth) the fetus will stay on the Lamb Intensive Care Unit (LICU) and taken care of by highly trained personnel. During mechanical ventilation the fetus is constantly sedated (also receiving analgesia and parenteral feeding) with continuous monitoring and interpretation of vital parameters. Moreover, the environment in the LICU (temperature, light, sound) will be kept optimal in order to reduce discomfort.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

This experiment is new and is not a repetition. The previous in vitro work is used to reduced the number of animals by avoiding a dose finding study.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Ewe: All surgical procedures are performed under anesthesia (including analgetic block).

Lamb: whilst on placental circulation, the lamb is sedated through anesthesia of the ewe. Ex utero experiments are performed under sedation guided by depth of sedation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Ewe:

Abortion might occur due to chorioamnionitis, but is very uncommon in sheep (8) (in retrospect over the past 10 years: 5 in 100). This is a major reason to use this species.

Fetus:

The fetus might experience pain, suffer from hemodynamic instability or respiratory complications (pneumothorax, hypoxia) or hypoglycemia.

Explain why these effects may emerge.

Due to their immaturity preterm fetuses are not always able to respond properly to environmental changes. The fetus might experience pain, suffer from hemodynamic instability or respiratory complications (pneumothorax, hypoxia).

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

Ewe:

All invasive procedures are performed under aseptic conditions.

The ewe will not recover from anesthesia.

Fetus:

The fetus will be sedated continuously after birth to minimise discomfort, also receiving analgesia. Environmental conditions (light, temperature, sounds) on the LICU are all in favour of the fetus.

Continuous monitoring of hemodynamic and respiratory enables us to treat or prevent the complications. Intravenous administration of glucose will prevent hypoglycemia (regularly checked)

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 for ewes:

- Pending preterm labor
- Intra-uterine fetal death
- Sepsis/ infection not responding to treatment
 - o **Local (at the site of intra-amniotic injection):** redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
 - o **Systemic:** Fever, lethargy, excessive time lying down
- Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)

Humane endpoints for fetus:

- Untreatable pneumothorax
- Uncorrectable severe respiratory acidosis
- Sepsis Uncorrectable hypovolemia
- Multi-organ failure

Indicate the likely incidence.

Ewe: 5%

Fetus: 10%

K. Classification of severity of procedures

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

Ewe: Moderate

Lamb: Non-recovery. During the mechanical ventilation, the lambs are continuously anesthetized (sedation and analgesia), and will not regain conscience, until the end of the experiment (euthanasia). Therefore, we consider the classification of the experiment to be non-recovery.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The ewe will be euthanized since we cannot reuse her for other purposes due to an intra-uterine infection and abdominal surgery.

The lamb will be euthanized since vital organs (i.e. lungs) have to be sampled for biochemical analysis.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10700	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		2	Ventilation-induced lung injury

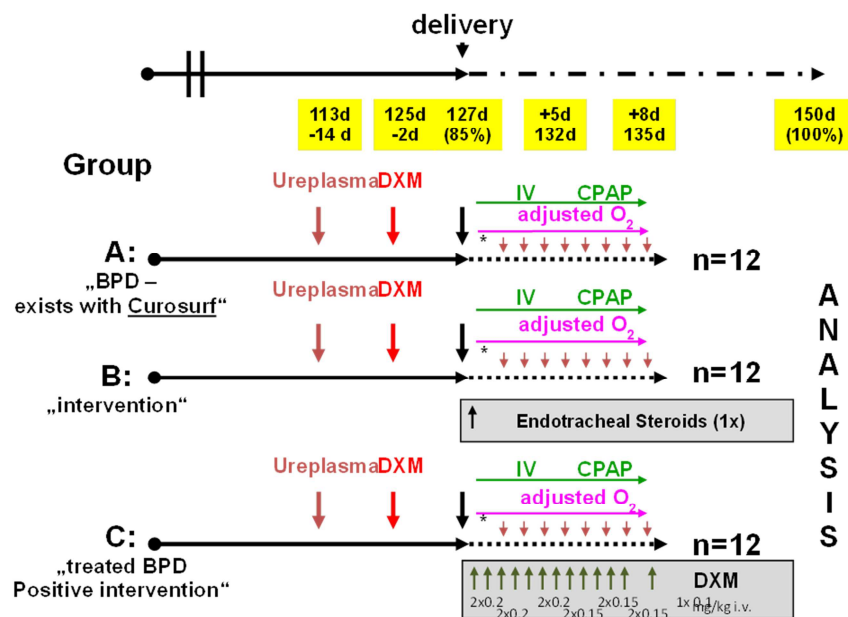
Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We induce intra-uterine inflammation with intra-amniotic injections of *Ureaplasma Parvum*, since this micro-organism is the most commonly found micro-organism in human chorioamnionitis cases. Previous studies already validated this approach and the same amount of colony forming units will be administered in the current study. The presence of chorioamnionitis can only be confirmed after birth which will be done by histological examination of the fetal membranes and placenta. The fetuses are delivered preterm by C-section (127d), sedated and mechanically ventilated for a maximum of 8 days in order to develop (histological) BPD [1]. During mechanical ventilation the lambs are treated with a glucocorticoid either by local instillation with surfactant or systemically. We compare endotracheal treatment (B) with intravenous treatment (C), a third group serves as control (A, see figure 1). A fourth group (D) will not be ventilated, but delivered on the same gestational age that autopsy is performed in the other three groups (127d+8d=135d). This group is used to identify the effects of chorioamnionitis with/without dexamethasone on lung inflammation, lung compliance, lung development and lung injury in comparison to mechanically ventilated animals (Figure 1). The following primary and secondary outcome parameters will assess feasibility, safety and efficacy of a topical administered glucocorticoids:



D: phenotype: lambs delivered at 135 d n=12

- D1 after DXM and ureaplasma; N=8
- D2 without any intervention; N=4

Figure 1 Experimental design: (Brown arrow: intra amniotic injection of UP, red arrow i.m. injection of dexamethason to mother; black arrow: delivery; small downward arrows: surfactant replacement therapy, * indicates that surfactant redosing does not follow a fixed scheme but is done dependent on oxygenation index; small upward arrows: corticosteroids to lamb.)

Primary outcome parameters: Survival. Both intrauterine inflammation and preterm birth are major risk factors for neonatal death due to complications that arise from underdeveloped organ systems. BPD is recognized as major factor in mortality in preterm infants. Treatment might improve survival compared to controls.

Secondary outcome parameters: Lung inflammation, lung compliance, lung development and lung injury, brain injury, brain development.

Lambs are the most appropriate animals to address our hypothesis, for a number of reasons:

1. Development of the lungs in sheep has been sufficiently studied to allow informed experimental design and integration of findings with those from previous studies. The current surfactant replacement therapy was developed in preterm lambs.

2. Preterm lambs are large enough to use similar equipment for ventilation as in the neonatal intensive care unit, provide sufficient blood and tissue to allow enough biomolecular analyses, for thorough assessment of the biological systems being investigated, in individuals.

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

UP is administered by ultrasound-guided intra-amniotic injection. 2 days before preterm delivery, the ewes will be given an intramuscular injection of dexamethasone, which enhances fetal lung maturation and allows the fetus to be ventilated postnatally. Moreover, maternal intramuscular dexamethasone administration mimics the clinical standard nowadays.

Fourteen days after the inoculation with UP, the fetus will be born preterm by **C-section** (general anesthesia): while remaining on placental circulation umbilical vessel catheters are placed for administration of medication (i.e. anesthesia) and blood gas analysis and an endotracheal tube is placed for ventilatory support (modified EXIT procedure). The lamb is immediately placed in our lamb intensive care unit which resembles the clinical intensive care very closely. Before connection to mechanical ventilation the lambs receive surfactant replacement therapy which is repeated if necessary (based on oxygenation). The lambs remain under ventilatory support for **3 days** while **anesthesia** is maintained and subsequently on respiratory support with CPAP (continuous positive airway pressure). Animals are maximum 8 days in the experiment. During these days, repetitive doses of glucocorticoids or sham treatment will be administered endotracheally or i.v. (Figure 1).

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

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism. Based on a power calculation, and taking into account a loss of 25% in total of the animals due to complications of intra-uterine inflammation (10%), premature birth (5%) and humane endpoints in lambs (10%) we calculated a total number of animals per experimental groups will which be **12**. The total number of animals needed for the current study will by 4 groups * 12 animals = **48 animals**.

We cannot predict the number of twin pregnancies, since multiple factors (e.g. seasonal vs. out of season breeding and the age of the ewe) are of influence. Therefore, the number of ewes is based on singleton pregnancies. In the case of twin pregnancy, the total number of ewes used for the experiment will be reduced.

B. The animals

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

The total number of animals needed for the current study will by 4 groups * 12 animals = 48 animals.

We will deliver 36 animals at **127d** (group A-C). Animals will receive receive ventilation and ventilator support for 8 days, therefore autopsy will also be performed on **day 135**. (figure 1). In group D, N=8 lambs are delivered at **135 d** after DXM and ureaplasma and N=4 without any intervention to assess the lung changes (lung inflammation, lung compliance, lung development and lung injury) due to chorioamnionitis and due to the immaturity at birth.

The other are intubated upon delivery.

Lambs are the most appropriate animals to address our hypothesis, for a number of reasons:

1. Development of the lungs in sheep has been sufficiently studied to allow informed experimental design and integration of findings with those from previous studies. The current surfactant replacement therapy was developed in preterm lambs.
2. Preterm lambs are large enough to use similar equipment for ventilation as in the neonatal intensive care unit, provide sufficient blood and tissue to allow enough biomolecular analyses, for thorough assessment of the biological systems being investigated, in individuals.

This experiment will be performed with a maximum of 48 pregnant sheep (Texel breed) and their respective singleton or twin fetuses (> 2/3 gestation, max. 48 fetuses) that are randomly allocated into 4 experimental groups consisting of 3 different glucocorticoid regimes, and one control group (cf. Appendix 1). If there are twin pregnancies less pregnant ewes will be needed. The gestational age at which the lambs in the ventilation groups are delivered (127d gestational age) is based on the developmental biology in which the sheep is very similar to a preterm infant (figure 2). In contrast to rodents, ovine lung development (alveolarization) starts prenatally and is prolonged postnatally. Moreover, the size allows for usage of similar equipment and ventilation strategies as is currently used in clinical practice. Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate in utero growth.

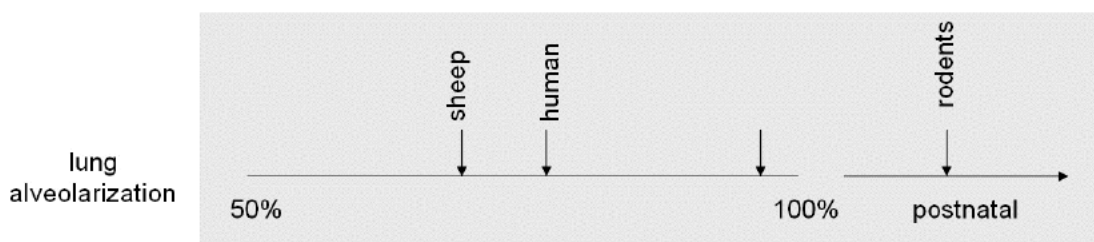


Figure 2 Time-points are shown when lung alveolarization, an important hallmark of lung maturation, occurs in different species. Lung maturation in sheep occurs prenatally, as in humans. Lung maturation in rodents takes place after birth.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The use of preterm lambs has been suggested by the European Medical Agency (EMA)

to pharmaceutical companies. We have done studies with synthetic surfactant (Seehase et al., 2012) with were mandated by the EMA in order to show in vivo the safety and feasibility of the new drug. It is unacceptable to test directly in human babies based on exclusively in vitro data by the standards of EMA and by good clinical practice since preterm babies is the most vulnerable patient population. In addition neonatology is full of examples of premature clinical trials with caused harm in the study population (e.g. phospholipid treatment for RDS).

Reduction: The groups A and B of this appendix are identical to the corresponding groups of Appendix 1. Once the experiments of Appendix 1 have identified which surfactant is superior we intend to use the animals from Appendix 1 for the purposes of Appendix 2 in order to reduce the number of animals.

Further, due to large experience with sheep and maintenance of lambs on the lamb intensive care unit we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise and experience of our team we have low numbers of drop-outs, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. These methods are in favor of reproducibility and use of previously obtained historical data and prevent unnecessary use and loss of animals. Moreover, we do not differentiate between genders since our clinical population consists of both sexes.

Furthermore, we are able to incorporate twin pregnancies in our study. This results in a reduction of pregnant ewes that will be used.

A variety of glucocorticoids have been tested in vitro and in vivo. In our current model we will use dosages defined on this pre-existing data.

Refinement: For this innovative technique of endotracheal administration of glucocorticoids to the preterm lung, the choice of animal model is based on the body size, use of similar equipment as in the neonatal intensive care and the developmental biology. In contrast to rodents, ovine and human the developmental biology are very similar (figure 2). For example, the alveolar phase in lambs and humans starts before birth in a hypoxic environment, compared to rodents in which the alveolarization starts postnatally in normoxic conditions. Therefore, we have established an animal model of immature lung-development in preterm lambs. Findings in our animal model can be easily translated into clinical practice. Our experiments will be conducted by a highly trained staff that can recognize and prevent discomfort. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment (group housing in a meadow) as we can with minimal human contact.

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

Ewe

Before induction of intra-uterine inflammation and the C-section the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water *ad libitum*. After induction of intra-uterine inflammation the sheep will be housed in groups with access to food and water *ad libitum*.

The sheep will be checked daily for discomfort due to intra-uterine inflammation. Discomfort due to intra-uterine inflammation is described in the human endpoint section. If necessary, analgesics are administered to treat pain.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up

the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling). The UP exposure does not result in pain, distress or sepsis.

Fetus

During intrauterine inflammation fetuses will not experience distress as demonstrated by no changes of fetal cortisol levels during chorioamnionitis [7].

Chorioamnionitis is a multi-organ disease resulting in discomfort after birth, as they need to survive independently and start using their immature and inflammation affected organs. However, after C-section (birth) the fetus will stay on the Lamb Intensive Care Unit (LICU) and taken care of by highly trained personnel. During mechanical ventilation the fetus is constantly sedated (also receiving analgesia and parenteral feeding) with continuous monitoring and interpretation of vital parameters. Moreover, the environment in the LICU (temperature, light, sound) will be kept optimal in order to reduce discomfort.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

This experiment is new and is not a repetition. The previous in vitro work is used to reduced the number of animals by avoiding a dose finding study.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Ewe: anesthesia during operation, local analgesia of surgical wounds.

Lamb: whilst on placental circulation, the lamb is sedated through anesthesia of the ewe. Ex utero experiments are performed under sedation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Ewe:

Abortion might occur due to chorioamnionitis, but is very uncommon in sheep [8]. This is a major reason to use this species.

Fetus:

The fetus will be sedated continuously after birth to minimise discomfort, also receiving analgesia.

Environmental conditions (light, temperature, sounds) on the LICU are all in favour of the fetus.

Explain why these effects may emerge.

Due to their immaturity preterm fetuses are not always able to respond properly to environmental changes.

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

Ewe:

All invasive procedures are performed under aseptic conditions.

The ewe will not recover from anesthesia.

The majority of the animals have been exposed to Ureaplasma. Therefore, re-use is not possible. All ewes will be euthanized after the c-section.

Fetus:

Environmental conditions (light, temperature, sounds) on the LICU are all in favour of the fetus. Pain will be prevented by continuous anesthesia. Continuous monitoring of hemodynamic and respiratory enables us to treat or prevent the complications. Intravenous administration of glucose will prevent hypoglycemia (regularly checked)

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 for ewes:

- Pending preterm labor
- Abortion caused by intra-uterine fetal death
- Sepsis/ infection not responding to treatment
 - o **Local (at site of injection):** redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be

- o treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
- o **Systemic:** Fever, lethargy, excessive time lying down
- Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)
 - o **Assessment of pain:**
 - Lack of appetite
 - Grinding of teeth
 - Reluctance to stand/ excessive time lying down
 - Lethargy/depression: an unresponsive sheep with hung head and dull eyes can indicate pain, illness or discomfort

Humane endpoints for lambs:

- Untreatable pneumothorax (absence of breath sounds)
 - Uncorrectable severe respiratory acidosis(based on blood gas analysis)
 - Sepsis (elevation of body temperature, elevation heart rate, blood gas analysis)
 - Uncorrectable hypovolemia (blood pressure, heart rate, blood gas analysis)
- Multi-organ failure (blood-pressure, heart rate, blood gas analysis)

Indicate the likely incidence.

Ewe: 5%

Fetus: 10%

K. Classification of severity of procedures

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

Ewe: moderate

Lamb:Non-recovery. During the mechanical ventilation, the lambs are continuously sedated and will not regain conscience, until the end of the experiment (euthanasia).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The fetus will be euthanized at the end of the experiment since examination of organ tissues is crucial to determine the effects of our treatment(s).

The ewes will be euthanized since we cannot reuse her for other purposes due to an intra-uterine infection an abdominal surgery.

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

Van: Dec Secretariaat [REDACTED]
Verzonden: woensdag 4 januari 2017 9:52
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: aanvullende informatie aanvraag AVD107002016783

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte commissie,
De DEC-UM dankt U voor Uw vragen en opmerkingen.
Hierbij de reactie van de DEC-UM:

Het PV bestaat uit twee strategieën, namelijk: 1) surfactant + glucocorticoiden --> geeft minder inactivatie van surfactant. 2) Glucocorticoiden postnataal intratracheaal vs systemisch ---> is een minder hoge dosis nodig? = hoopvolle behandeling tegen BPD.

Het stuk over wettelijk vereiste experimenten is volgens de DEC-UM correct, echter zijn de aangevraagde experimenten gericht op een nieuwe behandelstrategie (surfactant + intratracheale glucocorticoiden) en niet op het testen van (de veiligheid van) een potentieel nieuw middel. Zowel het (natuurlijke) surfactant als de corticosteroïden zijn al in gebruik in de kliniek. Het testen van de veiligheid van deze middelen is ook niet de focus van dit onderzoek. De focus is de mogelijke vermindering van negatieve effecten van (systemisch toegediende) corticosteroïden door deze in plaats van systemisch, direct in de longen toe te dienen. Wat het precieze effect daarvan is, is onbekend, en dus is translationeel onderzoek nodig, om te onderzoeken of het inderdaad een goede interventie zou zijn bij prematuren.

Wat betreft het ongerief: de lammetjes zijn eerst onder invloed van maternale anesthesie, en worden gedurende het hele verdere experiment onder sedatie met analgesie gehouden en worden nooit wakker. De DEC-UM is van mening dat dit een terminaal experiment, zoals de onderzoekers hebben aangegeven.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] /DEC-UM

[REDACTED]
[REDACTED]
www.maastrichtuniversity.nl/dec
Postbus 616, box 48, 6200 MD Maastricht
[REDACTED]

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: vrijdag 23 december 2016 15:36
To: Dec Secretariaat [REDACTED]
Subject: aanvullende informatie aanvraag AVD107002016783

Geachte DEC-UM,
Enige tijd geleden heeft u advies uitgebracht op een projectaanvraag met titel "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis" met aanvraagnummer AVD107002016783.

De volgende vragen zijn aan de aanvrager voorgelegd:


1) In uw aanvraag motiveert u de noodzaak om dit onderzoek uit te voeren door te melden dat de EMA naar het testen van de synthetische surfactant in lammetjes heeft gevraagd. Indien zo, zou dit project niet onder 'wettelijk vereist' onderzoek moeten vallen? Is het mogelijk om een officiële verzoek van de EMA naar ons toe te sturen? Indien niet, dan verzoeken we u om de reden dit al eerder uitgevoerd onderzoek in schapen te herhalen nader te onderbouwen.

2) In de aanvraag geeft u aan dat het ongerief van de lammetjes in de categorie terminaal valt, omdat de dieren vanaf de keizersnede onder verdoving worden gehouden. Daarnaast schrijft u onder punt I dat de foetussen pijn zouden kunnen ervaren, aan hemodynamische instabiliteit, respiratorische complicaties of hypoglycaemie zouden kunnen leiden. Bedoelt u dat dit gebeurt alleen als de dieren niet onder verdoving zijn of kunnen de lammetjes ook onder verdoving pijn ervaren?

3) In uw NTS geeft u aan 120 oaien en 120 lammetjes voor dit onderzoek te willen gebruiken, maar in de bijlages dierproeven zijn deze aantallen niet duidelijk aangegeven. In bijlage 1 is alleen het aantal lammetjes benoemd. We verzoeken u het aantal benodigde dieren duidelijker in de bijlages dierproeven te melden.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht
t.a.v. [REDACTED]
Minderbroedersberg 4-6
Postbus 616
6200MD Maastricht


**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
AVD107002016783

Uw referentie

Bijlagen

Datum 10 januari 2017
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven van u in behandeling. Het gaat om het project 'Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis' met aanvraagnummer AVD107002016783.

De CCD heeft uw aanvraag besproken, maar om een besluit te kunnen nemen heeft zij nog aanvullende informatie nodig. In deze brief leest u wat de CCD nog nodig heeft 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:

1) In uw aanvraag beschrijft u onderzoek te willen doen naar de efficiëntie van een synthetische surfactant in vergelijking met een natuurlijke (klinisch geaccepteerde) surfactant. Daarnaast meldt u dat alleen de natuurlijke surfactant geaccepteerd is voor gebruik in patiënten. Het blijkt toch dat in de Verenigde Staten al fase 2 klinische trials met de synthetische surfactant plaatsvinden. Dit betekent dat het gebruik van de synthetische surfactant in mens al toegestaan is, ongeacht de resultaten uit het in deze aanvraag beschreven project. Kunt u nader onderbouwen wat de toegevoegde waarde van dit experiment is gezien de al lopende klinische trials? Waarom is het noodzakelijk om wel de dierproeven uit te voeren?

2) In bijlage dierproeven 1 (Intra-uterine inflammation) schrijft u onder punt A op pagina 1: 'The fetuses are delivered preterm by C-section, sedated and mechanically ventilated for 48 hours during which they are treated with different surfactant preparations. Subsequently, animals receive ventilator support via CPAP for 5 days.' en op pagina 3: 'The lamb remains mechanically ventilated for 24 hours while *anesthesia* is maintained. Surfactant replacement therapy is repeated throughout the experiment if necessary. After 24 h the animals will be switched to continuous positive pressure ventilation for additional 6 days under

Datum

10 januari 2017

Onze referentieAanvraagnummer
AVD107002016783

sedation.' Het feit dat een keer het protocol wordt beschreven als 48h mechanische ventilatie + 5 dagen CPAP en een keer 24h + 6 dagen is verwarrend. Is er een verschil tussen de twee protocollen? Zo ja, graag dat uitleggen. Zo nee, graag uw aanvraag aanpassen met het correcte protocol.

Opsturen binnen veertien dagen

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

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project. De CCD zal uw aanvraag in de eerstkomende vergadering opnieuw bespreken.

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.



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:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Naam		
Datum	-	- 20
Handtekening		

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 17 januari 2017 10:25
Aan: Info-zbo; [REDACTED]
Onderwerp: Re: aanvullende informatie aanvraag AVD107002016783
Bijlagen: Project DEC CCD 5-1-2017.docx; PV 2016-012 Appendix 1 - description animal procedure - Intra-uterine inflammation_revised_48h mechanical.docx

Dear [REDACTED]

Please find our additional information in the enclosure and the revised appendix.

Please do not hesitate to contact us for further information.

Best regards

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Maastricht University Medical Center

From: Info-zbo
Sent: Tuesday, January 10, 2017 1:25 PM
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: aanvullende informatie aanvraag AVD107002016783

Geachte [REDACTED]
Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven van u in behandeling. Het gaat om het project 'Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis' met aanvraagnummer AVD107002016783.
De CCD heeft uw aanvraag besproken, maar om een besluit te kunnen nemen heeft zij nog aanvullende informatie nodig. In de bijgaande brief leest u wat de CCD nog nodig heeft en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project. De CCD zal uw aanvraag in de eerstkomende vergadering opnieuw bespreken.

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

Project "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis" met aanvraagnummer AVD107002016783

Reply to questions from 5.1.2017

1) In uw aanvraag beschrijft u onderzoek te willen doen naar de efficiëntie van een synthetische surfactant in vergelijking met een natuurlijke (klinisch geaccepteerde) surfactant. Daarnaast meldt u dat alleen de natuurlijke surfactant geaccepteerd is voor gebruik in patiënten. Het blijkt toch dat in de Verenigde Staten al fase 2 klinische trials met de synthetische surfactant plaatsvinden. Dit betekent dat het gebruik van de synthetische surfactant in mens al toegestaan is, ongeacht de resultaten uit het in deze aanvraag beschreven project. Kunt u nader onderbouwen wat de toegevoegde waarde van dit experiment is gezien de al lopende klinische trials? Waarom is het noodzakelijk om wel de dierproeven uit te voeren?

The only licensed surfactant is a natural surfactant. The synthetic surfactant is in study but not approved/licensed. We want to study the effects in chorioamnionitis which is known to inactivate the exogenous surfactant [J Pediatr. 2010 Jan;156(1):10-15.e1]. In the clinical trial that you mention, chorioamnionitis is not included. Chorioamnionitis is a clinical situation in humans which has a high clinical variability since it is not known when the infection of the chorio/amnion starts and which bacteria cause it. The animal model of sheep offers a standardisation since it is known which bacteria causes the infection from which time point onwards. Therefore, the experiments are necessary to be performed in sheep since they cannot be performed in human perterm babies.

2) In bijlage dierproeven 1 (Intra-uterine inflammation) schrijft u onder punt A op pagina 1: *'The fetuses are delivered preterm by C-section, sedated and mechanically ventilated for 48 hours during which they are treated with different surfactant preparations. Subsequently, animals receive ventilator support via CPAP for 5 days.'* en op pagina 3: *'The lamb remains mechanically ventilated for 24 hours while anesthesia is maintained. Surfactant replacement therapy is repeated throughout the experiment if necessary. After 24 h the animals will be switched to continuous positive pressure ventilation for additional 6 days under sedation.'* Het feit dat een keer het protocol wordt beschreven als 48h mechanische ventilatie + 5 dagen CPAP en een keer 24h + 6 dagen is verwarrend. Is er een verschil tussen de twee protocollen? Zo ja, graag dat uitleggen. Zo nee, graag uw aanvraag aanpassen met het correcte protocol.

The description in the appendix is incorrect. It must read 48h of mechanical ventilation plus 5 days of CPAP throughout the experiments. We apologize for the mistake.

The document has been amended accordingly.

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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|----------------------------|
| 1 | Intra-uterine inflammation |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We induce intra-uterine inflammation with intra-amniotic injections of Ureaplasma Parvum (UP), since this micro-organism is the most commonly found micro-organism in human chorioamnionitis cases. Previous studies already validated this approach and the same amount of colony forming units will be administered in the current study. The presence of chorioamnionitis can only be confirmed after birth which will be done by histological examination of the fetal membranes and placenta. The fetuses are delivered preterm by C-section, sedated and mechanically ventilated for 48 hours during which they are treated with different surfactant preparations. Subsequently, animals receive ventilator support via CPAP for 5 days. We have formulated the following 6 experimental groups:

1. Control ventilation N=12
2. UP + Control ventilation N=12
3. UP + natural surfactant (Curosurf, clinical standard, porcine origin) N=12
4. UP + CHF5633 (synthetic surfactant) N=12
5. UP + natural surfactant (Curosurf) + glucocorticoid (Budesonide 0,25 mg/kg) N=12
6. UP + CHF5633+ glucocorticoid (Budesonide 0,25 mg/kg) N=12

Groups 1, 3 and 4 are necessary to assess the effects in the pattern of clinical practice. Group 1 will help to identify the inflammatory phenotype influencing treatment effect, group 3 is current clinical standard and group 4 will help to identify if the artificial surfactant itself has an effect on inflammation due to its different protein composition.

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism. Based on a power calculation, and taking into account a loss of 25% in total of the animals due to complications of intra-uterine inflammation (10%), premature birth (5%) and humane endpoints in lambs (10%) we calculated a total number of animals per experimental groups will which be 12.

Within these experimental groups the following primary and outcome parameters will be assessed:

Primary outcomes:

- Oxygenation (arterial oxygen partial pressure) in the course of ventilation: oxygenation is the main clinical parameter indicative for adequate ventilation)
- Repetitive dosing: depending on oxygenation: due to inactivation of surfactant, oxygenation might fail and additional boluses of surfactant are needed.
- Activity of surfactant recovered from the animals after sacrifice

The animals get colostrum and breast milk from sheep during the mechanical ventilation according to a feeding protocol from the neonatal intensive care unit with gastric tube feeding.

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

Time-mated Texel ewes will receive an intra-amniotic injection of *Ureaplasma Parvum* (UP):

Under sedation UP is administered by ultrasound-guided intra-amniotic injection. 2 days before preterm delivery, the ewes will be given an intramuscular injection of dexamethasone, which enhances fetal lung maturation and allows the fetus to be ventilated postnatally. Moreover, maternal intramuscular dexamethasone administration mimics the clinical standard nowadays.

Maternal administration should not be confused with postnatal steroid treatment in the fetus for BPD: Prenatal treatment of the mother is beneficial for the child because lung maturation is induced and mortality is decreased.

Postnatal treatment of the preterm infant has also been shown to positively influence the infants' lung, and BPD is decreased. However, corticosteroids given systemically to the infant have serious side effects on the neurodevelopmental outcome. Therefore, postnatal therapy can only be administered after balancing the positive effects on the lung and the negative effects on the brain, leading frequently to a therapeutic dilemma.

Administration of corticosteroids for longer periods of time induces abortion in sheep. However, a single

injection of dexamethasone, as administered in our proposed experiments, will not increase the risk of abortion (Fehrholz et al., Am. J. Physiology 2015) provided that the fetus will be born 48 hours after injection.

Previous experiments with intra-uterine Ureaplasma Parvum infection and treatment with dexamethasone demonstrated that dexamethasone 2 days prior to delivery did not have any effects on the immune response towards Ureaplasma Parvum

Seven days after the inoculation with UP, the fetus will be born preterm by **C-section** (general anesthesia): while remaining on placental circulation umbilical vessel catheters are placed for administration of medication (i.e. **anesthesia**) and blood gas analysis and an endotracheal tube is placed for ventilatory support (modified EXIT procedure). The lamb is immediately placed in our lamb intensive care unit which resembles the clinical intensive care very closely. Before connection to mechanical ventilation the lambs receive **surfactant replacement therapy** (according to their allocation). The lamb remains mechanically ventilated for 48 hours while **anesthesia** is maintained. Surfactant replacement therapy is repeated throughout the experiment if necessary. After 48 h the animals will be switched to continuous positive pressure ventilation for additional 5 days under sedation.

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

We have a preference for singleton pregnancies since this is more clinical relevant and twins can strongly affect each other's health (i.e. resulting in small for gestational age) however, to reduce the number of pregnant ewes we will use both singleton and twin pregnancies. Furthermore, we do not know in advance whether it will be a single or twin pregnancy and only selecting twin pregnancies will result in massive over-breeding. Group numbers were determined with the power-calculation according to Sachs, in which variance and expected therapeutic effects are based on previous experiments with surfactant in non-infectious sheep models.

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism

In ventilated preterm sheep (non-infectious model, Seehase et al., 2012) CHF5633 has shown a comparable effect on oxygenation but superior resistance against inactivation. Surfactant **re-dosing** in a 48-hour period of ventilation is the **critical outcome** in this experiment.

B. The animals

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

Lambs are the most appropriate animals to address our hypothesis, for a number of reasons:

1. Development of the lungs in sheep has been sufficiently studied to allow informed experimental design and integration of findings with those from previous studies. The current surfactant replacement therapy was developed in preterm lambs.

2. Preterm lambs are large enough to use similar equipment for ventilation as in the neonatal intensive care unit, provide sufficient blood and tissue to allow enough biomolecular analyses, for thorough assessment of the biological systems being investigated, in individuals.

The total number of animals needed for the current study will be 6 groups * 12 animals = 72 animals. We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism. Based on a power calculation, and taking into account a loss of 25% in total of the animals due to complications of intra-uterine inflammation (10%), premature birth (5%) and humane endpoints in lambs (10%) we calculated a total number of animals per experimental groups will be 12.

We cannot predict the number of twin pregnancies, since multiple factors (e.g. seasonal vs. out of season breeding and the age of the ewe) are of influence. Therefore, the number of ewes is based on singleton pregnancies. In the case of twin pregnancy, the total number of ewes used for the experiment will be reduced.

The gestational age at which the lambs are delivered (129-132d gestational age) is based on the developmental biology in which the sheep is very similar to a preterm infant (figure 1). In contrast to rodents, ovine lung development (alveolarization) starts prenatally and is prolonged postnatally. Moreover, the size allows for usage of similar equipment and ventilation strategies as is currently used in clinical practice. Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate in utero growth.

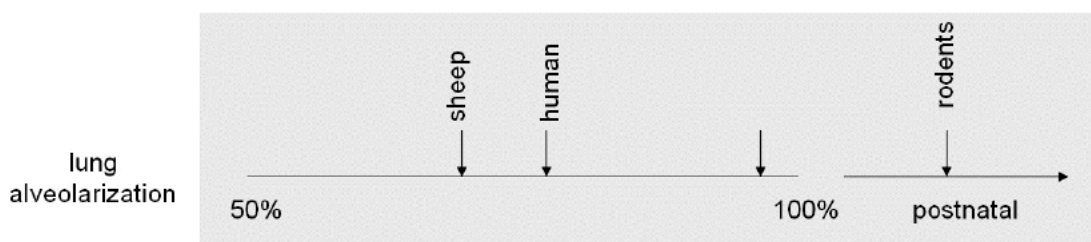


Figure 1 Time-points are shown when lung alveolarization, an important hallmark of lung maturation, occurs in different species. Lung maturation in sheep occurs prenatally, as in humans. Lung maturation in rodents takes place after birth.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The use of preterm lambs has been suggested by the European Medical Agency (EMA) to pharmaceutical companies. We have done studies with synthetic surfactant (Seehase et al., 2012) with were mandated by the EMA in order to show in vivo the safety and feasibility of the new drug. It is unacceptable to test directly in human babies based on exclusively in vitro data by the standards of EMA and by good clinical practice since preterm babies is the most vulnerable patient population. In addition neonatology is full of examples of premature clinical trials with caused harm in the study population (e.g. phospholipid treatment for RDS).

Reduction: Due to large experience with sheep and maintenance of lambs on the lamb intensive care unit we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise of our team, we have low numbers of drop-outs which decreased over the years with increasing experience, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. These methods are in favor of reproducibility and use of previously obtained historical data (also on CHF 5633 inactivation (2)) and prevent unnecessary use and loss of animals. Moreover, we do not differentiate between genders since our clinical population consists of both sexes. Furthermore, we are able to incorporate twin pregnancies in our study. This results in a reduction of pregnant ewes that will be used. We rely on natural breeding. Therefore, we cannot control for singleton or twin pregnancies.

Refinement:

For this experiment in which different surfactant preparations are tested, the choice of animal model is based on the body size, use of similar equipment as in the neonatal intensive care and the developmental biology. In contrast to rodents, ovine and human the developmental biology are very similar. For example, the alveolar phase in lambs and humans starts before birth in a hypoxic environment, compared to rodents in which the alveolarization starts postnatally in normoxic conditions. Therefore, we have established an animal model of immature lung-development in preterm lambs. Findings in our animal model can be easily translated into clinical practice. Our staff and the staff of the animal care facility have been trained by a Texel sheep breeder to recognize symptoms of pending labor and give assistance to the sheep upon labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment (group housing in a meadow) as we can with minimal human contact. Moreover, the fetus will receive analgesia and nutritional support (glucose) during mechanical ventilation.

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

on the environment.

Ewe

Before induction of intra-uterine inflammation the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water *ad libitum*. After induction of intra-uterine inflammation the sheep are housed in groups with access to food and water *ad libitum*.

The sheep will be checked daily for discomfort due to intra-uterine inflammation. Discomfort due to intra-uterine inflammation is described in the humane endpoint section. Post-operative (after intra-amniotic injection) antibiotics, if necessary, will be administered, in order to prevent progression of (wound) infection.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).

The majority of the animals have been exposed to Ureaplasma. Therefore, re-use is not possible. All ewes will be euthanized after the c-section.

Fetus

Previous experiments have demonstrated that fetal cortisol levels do not change in the course of chorioamnionitis (Jobe et al, Am J Respir Crit Care Med. 2000 Nov;162(5):1656-61). This suggests that the fetus will experience limited discomfort during intra-uterine inflammation in our experiments.

Chorioamnionitis is a multi-organ disease resulting in discomfort after birth, as they need to survive independently and start using their immature and inflammation affected organs. However, after C-section (birth) the fetus will stay on the Lamb Intensive Care Unit (LICU) and taken care of by highly trained personnel. During mechanical ventilation the fetus is constantly sedated (also receiving analgesia and parenteral feeding) with continuous monitoring and interpretation of vital parameters. Moreover, the environment in the LICU (temperature, light, sound) will be kept optimal in order to reduce discomfort.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

This experiment is new and is not a repetition. The previous in vitro work is used to reduced the number of animals by avoiding a dose finding study.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Ewe: All surgical procedures are performed under anesthesia (including analgetic block).

Lamb: whilst on placental circulation, the lamb is sedated through anesthesia of the ewe. Ex utero experiments are performed under sedation guided by depth of sedation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Ewe:

Abortion might occur due to chorioamnionitis, but is very uncommon in sheep (8) (in retrospect over the past 10 years: 5 in 100). This is a major reason to use this species.

Fetus:

The fetus might experience pain, suffer from hemodynamic instability or respiratory complications (pneumothorax, hypoxia) or hypoglycemia.

Explain why these effects may emerge.

Due to their immaturity preterm fetuses are not always able to respond properly to environmental changes. The fetus might experience pain, suffer from hemodynamic instability or respiratory complications (pneumothorax, hypoxia).

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

Ewe:

All invasive procedures are performed under aseptic conditions.

The ewe will not recover from anesthesia.

Fetus:

The fetus will be sedated continuously after birth to minimise discomfort, also receiving analgesia. Environmental conditions (light, temperature, sounds) on the LICU are all in favour of the fetus.

Continuous monitoring of hemodynamic and respiratory enables us to treat or prevent the complications. Intravenous administration of glucose will prevent hypoglycemia (regularly checked)

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 for ewes:

- Pending preterm labor
- Intra-uterine fetal death
- Sepsis/ infection not responding to treatment
 - o **Local (at the site of intra-amniotic injection):** redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
 - o **Systemic:** Fever, lethargy, excessive time lying down
- Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)

Humane endpoints for fetus:

- Untreatable pneumothorax
- Uncorrectable severe respiratory acidosis
- Sepsis Uncorrectable hypovolemia
- Multi-organ failure

Indicate the likely incidence.

Ewe: 5%

Fetus: 10%

K. Classification of severity of procedures

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

Ewe: Moderate

Lamb: Non-recovery. During the mechanical ventilation, the lambs are continuously anesthetized (sedation and analgesia), and will not regain conscience, until the end of the experiment (euthanasia). Therefore, we consider the classification of the experiment to be non-recovery.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The ewe will be euthanized since we cannot reuse her for other purposes due to an intra-uterine infection and abdominal surgery.

The lamb will be euthanized since vital organs (i.e. lungs) have to be sampled for biochemical analysis.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



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

AVD107002016783

Bijlagen

1

Datum 1 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 15 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis" met aanvraagnummer AVD107002016783. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 2 en 17 januari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vragen van de CCD met betrekking tot de toegevoegde waarde van uw project, over de ongeriefclassificatie en over het aantal dieren.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld. De voorwaarde over afstemming met de IvD wordt gesteld om te voorkomen dat dieren onnodig worden gebruikt indien de eerste experimenten niet de verwachte resultaten opleveren.

U kunt met uw project "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 februari 2017 tot en met 1 januari 2022. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 15 december 2016. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:
1 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002016783

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.

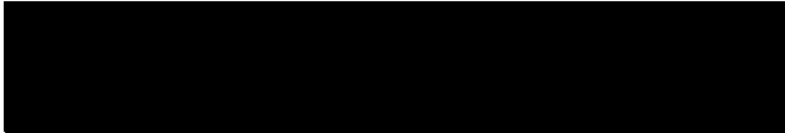
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<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:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
1 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002016783



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht

Adres: Postbus 616

Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT

Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2017 tot en met 1 januari 2022, voor het project "Therapeutic interventions to improve neonatal pulmonary outcomes in the course of chorioamnionitis" met aanvraagnummer AVD107002016783, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Professor experimental perinatology.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 december 2016, ontvangen op 15 december 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 2 en 17 januari 2017

Aanvraagnummer:
AVD107002016783

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Intra-uterine inflammation				72 oaien en 72 lammetjes (foetussen).
	Schapen (Ovis aries) /	144	50% Terminal 50% Matig	
3.4.4.2 Ventilation-induced lung injury				48 oaien; 48 lammetjes (foetussen)
	Schapen (Ovis aries) /	96	50% Terminal 50% Matig	

Voorwaarden

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

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten en het voortzetten van de tweede dierproef worden afgestemd met de IvD.



Aanvraagnummer:

AVD107002016783

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:
AVD107002016783

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2016785	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Project proposal			x						
4	bijlage animal procedure 1			x						
5	bijlage animal procedure 2			x						
6	bijlage animal procedure 3			x						
7	bijlage animal procedure 4			x						
8	aanvullende informatie				x		x	x		
9	DEC advies				x		x	x		
10	Advies CCD aan bestuur		x						x	
11	Beschikking				x		x	x		
12	herziene beschikking				x		x	x		



20 DEC. 2016

Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 / 285 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>50169181</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg 4-6</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD Maastricht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	50169181	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6	Postbus	616	Postcode en plaats	6200 MD Maastricht	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	50169181																	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6																	
Postbus	616																	
Postcode en plaats	6200 MD Maastricht																	
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																	
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>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(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.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(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 1 - 2 - 2017
- Einddatum 1 - 2 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Deep brain stimulation to restore memory loss
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Diepe hersenstimulatie bij geheugenverlies
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-UM
- Postadres Postbus 616, 6200 MD Maastricht
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1584,00 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
-

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondertekende 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	Maastricht
Datum	14 - 12 - 2016
Handtekening	[Redacted]



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Deep brain stimulation (DBS) is a frequently used treatment alternative for various neurological and psychiatric disorders. In DBS, electrodes are stereotactically implanted in a target area of the brain and then connected to an implanted pulse generator. Attenuation of disease symptoms is then achieved by delivering an electric current to the targeted neuronal network. Currently, DBS is successfully used in the

treatment of drug-refractory movement disorders such as Parkinson's disease. The relatively low incidence of treatment-induced permanent neurological damage, reversible nature of the technique and possibility of tailoring stimulation parameters has proven this technique safe and patient-friendly. As such, DBS has become a valuable addition to common, generally more invasive, neurosurgical techniques. Subsequently, a growing number of psychiatric applications are being investigated for DBS, including depression and obsessive-compulsive disorder [1]. Recently, DBS has been suggested to be a promising new treatment modality for Alzheimer's Disease (AD) [2].

Evidence from recent clinical case studies suggests that DBS might enhance memory functions, when particular areas in the brain are stimulated [3]. In a single-case study, DBS was performed to treat a patient with morbid obesity, but unexpectedly stimulation evoked detailed autobiographical memory events. In the same year Vignal and coworkers showed that hallucinations of autobiographic memory could be evoked by stimulation of the amygdala, hippocampus and parahippocampal gyrus in epilepsy-patients [4].

Following these serendipitous findings, a few studies have tried to stimulate structures of the so-called memory circuit of the brain and have found beneficial effects when applying DBS correspondingly to the fornix [3, 5-7] or the entorhinal cortex [8, 9]. These structures are all directly connected to the hippocampus. Attention has also been drawn to the nucleus basalis of Meynert as a potential target structure for DBS in AD [10], since it has wide projections to the neocortex and the hippocampus. In the pathogenesis of AD the nucleus basalis of Meynert degenerates, leading to decreased cholinergic transmission and ultimately to cognitive decline in patients.

An important issue that needs to be raised is that up to now, most DBS studies in psychiatric disorders were first conducted in humans. In contrast to the application of DBS in Parkinson's disease, its use in AD is clearly short in preclinical evidence [11]. It is generally accepted that this therapy can be improved by obtaining knowledge of the optimal stimulation paradigms, the involved neuronal networks, DBS target areas and neurophysiological responses to acute and chronic DBS [12]. In our previous published studies [13], we observed that we can mimic both the therapeutic and side effects of DBS in animal models of various neurodegenerative diseases. This has led to new insights in to the neuronal networks affected by DBS and the mechanism of action [14]. Similar to recent clinical developments of DBS, we are evaluating DBS in animal models of other neurological and psychiatric disorders. With the studies proposed here, we aim to increase the therapeutic effect and decrease side effects of DBS by characterizing the optimal stimulation paradigm, DBS target area and desired neurophysiological response in an animal model. The primary outcomes are therefore the cognitive effects and behavioral side effects of different DBS stimulation paradigms. To identify the neuronal networks, brain regions and neurotransmitters involved, we will use intracranial sampling and recording methods, as well as imaging methods. Based on these first studies, we also want to investigate whether DBS is disease-modifying. For this we plan an experiment with a transgenic AD model. Lastly, we want to examine whether the effects of DBS can be enhanced by using drug treatments. The choice for these drug treatments is dependent on the underlying mechanism of DBS. However, considering standard medication for AD, we predict it will be modulators of the glutamate and cholinergic neurotransmitter systems, such as Memantine, Donepezil, Rivastigmine, Galantamine or similar.

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?

Based on the previous results of DBS in demented patients and studies in animal models of dementia, we hypothesize that DBS influences neuronal networks that are associated with cognition, mood and anxiety. In the current proposal, we address this hypothesis in four studies. First, we make an inventory of the cognitive effectiveness and occurrence of behavioral side effects upon DBS comparing the fornix to the nucleus basalis of Meynert within the memory circuit using different stimulation paradigms. Secondly, we evaluate the mechanism of action at the level of neuroanatomical network dynamics and neurophysiology. Thirdly, we want to investigate whether DBS is disease-modifying. For this we plan to conduct experiments with a model of disease. Finally, we investigate if the efficacy of DBS can be enhanced by drug treatments in our AD model. To meet these goals, we defined the following research objectives:

1. Define the cognitive and side effects of DBS in different stimulation paradigms.
- 2a. Analyse neurotransmitter changes induced by acute and chronic DBS.
- 2b. Identify acute and chronic DBS-induced changes in brain activity.
3. Define whether DBS can be disease-modifying.
4. Identify a drug treatment that increases the cognitive effect of DBS in a model of disease.

The above described research objectives may help to improve current DBS treatment of AD and reduce side effects. The feasibility of the proposed experiments is warranted as the involved research group has extensive experience with the surgical procedure of DBS, behavioral testing, brain imaging and intracranial sampling and recording methods as illustrated by publications. We expect to complete these studies within 5 years.

3.3 Relevance

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

Today, more than 44.4 million people suffer from dementia [15]. This number will increase to about 135.5 million in 2050. Every year 7.7 million new cases of dementia are diagnosed, implying that there is a new case of dementia somewhere in the world every four seconds. Dementia has emerged as one of the leading health problems of our time and has been recently recognized as one of the major threats to world population [16]. Symptoms include progressive loss of memory, impaired reasoning and judgement, difficulties paying attention, communication problems and various non-cognitive symptoms, ultimately leading to disability and need for care.

Most individuals diagnosed with dementia are 65 years or older, although there is a growing awareness of cases that start before the age of 65 [15]. Demographic ageing is a worldwide process resulting from constantly improving health care systems. The fastest growth in the elderly population is taking place in China, India, and their south Asian and Pacific neighbors. In 2010, the total estimated worldwide cost of dementia was US\$604 billion, which equals to around 1% of the world's gross domestic product [17]. About 70% of the costs occur in Western Europe and North America.

Unfortunately, despite decades of research, we are still in need of an effective therapy for dementia, symptomatic or curative. There are 4 approved drugs on the market, which either modulate the cholinergic system by inhibiting acetylcholinesterase or reduce glutamate by antagonizing specific glutamate receptors [18]. These pharmacological interventions, however, have limited efficacy and severe-side effects for patients; therefore, we are in need of new, effective, and safe alternative treatment options.

Recently, deep brain stimulation (DBS) has shown to have beneficial effects across memory and cognitive networks. A first evidence for this emerged when Hamani and colleagues stimulated the fornix/hypothalamus area in a patient suffering from morbid obesity [3]. In this specific case, DBS generated detailed autobiographical memories in the patient. Based on this case-observation, the same group performed a phase-I trial in which six patients with mild Alzheimer's Disease (AD) were implanted with electrodes in the vicinity of the fornix [6]. After an intraoperative evaluation of stimulation to survey for recollective experiences and adverse effects, patients received chronic high frequency DBS for a period of 12 months (3.0–3.5 V, 130 Hz and 90 μ s pulse width). The authors have found that the application of DBS in the hypothalamus/fornix vicinity was safe and triggered neural activity in the memory circuit, including the entorhinal and hippocampal areas. PET scans showed an early and striking reversal of the impaired glucose utilization in the temporal and parietal lobes that was maintained after 12 months of continuous stimulation. Evaluation of the Alzheimer's Disease Assessment Scale cognitive subscale and the Mini Mental State Examination suggested possible improvements and slowing the progression of memory loss at 6 and 12 months, especially in patients that were less severely affected at the time of surgery. In fact, 2 out of 6 patients showed cognitive improvements, 1 patient remained stable and the other 3 deteriorated. Indeed, our presented project proposal is partly build upon this study. Because the clinical results were inconclusive, we feel that it is important to investigate the effects of DBS on the fornix with a variety of stimulation parameters and also to examine neurochemical and neurophysiological responses. Because, despite the encouraging results of the clinical trials presented above, basic neural and chemical mechanisms underlying DBS are still debated [19] and one approach to address these issues is to investigate the effects by stimulating homologous regions in experimental

animal models [12].

Therefore, the studies described in this proposal aimed at investigating which DBS target structures and stimulation parameters produce the most beneficial effects in an experimental model of dementia. In addition, the present proposal also aimed at investigating potential mechanisms of action of DBS with regard to memory restoration. Only through understanding the mechanisms, DBS therapy in dementia patients can be fine-tuned to produce the best possible symptom relief currently available.

3.4 Research strategy

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

The first goal is to compare the cognitive effect of different DBS stimulation paradigms and characterize the side effects on behavior. To achieve this, we stereotactically implant electrodes in the fornix or nucleus basalis of Meynert to apply DBS. EEG electrodes are implanted in the hippocampus in order to measure changes in theta rhythm. After implantation, DBS animals will be subjected different stimulation parameters while sham animals are only attached to cables and not stimulated. Their behavior will be evaluated in several tests. Memory impairment is induced pharmacologically by injecting scopolamine intraperitoneally 30 min before behavioral testing. Also proliferative cells will be labeled during this study and the effects on neurogenesis will be evaluated. The second goal is to evaluate the mechanism of action on the level of neuronal networks, brain regions and neurotransmitters. To evaluate neurotransmitter and neurophysiological responses of brain regions, we will use intracranial sampling (microdialysis to measure neurotransmitter levels; optical fiber probes for fiber photometry to measure brain activity), EEG recording (electrophysiology) and imaging methods (PET-CT imaging). We will evaluate these responses in both, a terminal acute DBS experiment and a chronic DBS experiment. Acute experiments will be performed during surgery or immediately afterward and will give insights to immediate mechanisms of action of DBS. Chronic experiments are conducted after the complete restoration of the physiological functions that were altered by anesthesia or surgery and will provide insights to the long-term effects of DBS in the brain. The third goal is to evaluate if DBS is disease-modifying. For this, we plan to conduct experiments in an AD rat model. Finally, we want to investigate whether cognitive effects can be enhanced in this AD rat model by using drug treatments. We will compare the effect of different drug treatments combined with DBS on the cognitive effect, generation of side effects and neurotransmitters and neurophysiological responses. To evaluate this, we will use a selection of the behavioral tests, intracranial sampling/recording methods and imaging methods used in the first studies of the project.

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

This project consists of four studies. Our group has accumulated sufficient experiences with all procedures described below [5, 13, 14, 20-23].

Study 1 - The effects of DBS on cognition, behavior and neuronal networks. Animals are first subjected to a baseline measurement of neuronal networks using preclinical imaging methods under general anesthesia, subsequently brain electrodes are implanted as described below in the DBS procedure. In order to measure cognitive effects with DBS, memory impairment is pharmacologically-induced for the duration of the behavioral tasks. Next, animals are subjected to behavioral tests centered around memory, cognition, mood and anxiety in DBS stimulation on and off periods. The cognitive effect will also be indicated by labelling proliferative cells in order to assess neurogenic changes. After behavioral testing, electrodes will be removed and the effect of DBS on neuronal networks will be assessed by brain imaging identical to the baseline measurement. At the end of the experiment, all animals are euthanized.

Study 2 - Changes in neurotransmitters and brain activation induced by acute and chronic DBS. Animals are subjected to the same surgical procedure for implantation of the DBS electrodes. During surgery intracranial sampling probes for neurotransmitter sampling (microdialysis) and measuring brain activity (fiber photometry) are placed in the hippocampus.

Animals that receive acute DBS will only be stimulated for a short period of time under general

anesthesia. During this session, intracranial sampling and recording probes are used to assess the changes in neurotransmitters and brain activation induced by acute DBS. At the end of this session, animals will be sacrificed.

Animals that receive chronic DBS undergo the same surgical procedure for DBS electrode and hippocampal probe implantation, and are left to recover as described in the DBS procedure below. Similar to study 1, memory impairment is pharmacologically-induced for the duration of the behavioral task and these animals are then subjected to behavioral tests with DBS stimulation on and off. Subsequently, in freely moving rats, intracranial sampling probes are used to assess the changes in neurotransmitters and brain activation induced by chronic DBS. Subsequently animals will receive general anesthesia and will be subjected to intracranial electrophysiology recording, fiber photometry or PET-CT brain imaging. Afterwards, all animals will be euthanized.

Study 3 – This experiment is only carried out in case we can restore memory loss by DBS in study 1 using specific stimulation parameters. Study 3 is a long-term DBS study in a Alzheimer model of disease in order to define whether DBS is disease-modifying. The primary goal of this study is to see if DBS has a positive effect on brain pathology in AD. DBS electrodes and hippocampal probes are implanted by stereotactic brain surgery. Subsequently, behavioral tests, intracranial sampling and electrophysiological recordings which we will derive from study 2, will be carried out. Afterwards, all animals will be euthanized.

Study 4 - This experiment is also only carried out in case we can restore memory loss by DBS in study 1 using specific stimulation parameters. Study 4 investigates the role of neuropharmacology in DBS for dementia. This study is performed to see if we can further enhance memory through combining DBS with neuropharmacology. Animals are subjected to the same surgical procedure for implantation of the DBS electrodes as described below and in study 1-2. Thereafter, animals are treated with a selection of drugs or receive a placebo. Similar to study 1, animals will be subjected to behavioral tests and DBS stimulation on and off periods to evaluate the cognitive effect and generation of side effects. Intracranial sampling and recording probes are used to study the underlying mechanism, similar to study 2. Afterwards, all animals will be euthanized.

*DBS procedure: Animals will undergo stereotactic surgery for electrode implantation. Under general anesthesia, rats will be implanted with DBS electrodes [23] bilaterally in the fornix or nucleus basalis of Meynert and will receive one additional electrode in the hippocampus. The electrodes will be fixed on the skull. The electrodes are connected to an external pulse generator for stimulation and EEG recordings through the hippocampal electrode in freely moving rats. After surgery, animals will receive a recovery period of at least 1 week. Following this, behavioral testing is performed with DBS. Sham animal will undergo the same surgical procedure, but are not stimulated through the electrodes. Depending on the behavioral test paradigm animals are additionally trained before surgery. Stimulation can be performed at different parameters such as low and high frequency stimulation (20 to 130 Hz) with various amplitudes (50 to 500 μ A) and pulse widths up to 100 μ s [24]. Please note, for testing various stimulation parameters, we included a minimum of 24h stimulation-off period for all animals.

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

In this project, we aim to define the cognitive effects and behavioral side effects of DBS in different stimulation paradigms, underlying mechanisms and our ability to influence this mechanism with DBS and neuropharmacology. To illustrate the effect of DBS on the brain we provide information on several coherent levels. We will provide information on the cognitive effect, information on behavioral side effects, and information on underlying mechanism of neuronal networks, neurotransmitters and brain regions. We will also study the additional influence of different drug treatments. This multimodal project will investigate the effects of DBS from the level of behavior to neurotransmitter and back again. This project entails the following selection points and milestones. The timeline of this research project is summarized in Figure 1 while the Go-NoGo criteria are summarized in Figure 2. Since fornix and nucleus basalis of Meynert DBS have been already applied experimentally in the clinics with inconclusive results [6, 10], we will explicitly perform study 1 and 2, in order to elucidate on optimal stimulation protocols or

underlying acute and chronic mechanisms (i.e. all experimental groups in study 1 and 2 will be used). Refinement of study 2 is achieved by only stimulating animals with the most optimal stimulation parameter derived from study 1. Study 3 and 4 are dependent on the results obtained in study 1 and 2 (non-significant findings in study 1 and 2 will lead to termination of the project). Moreover, only the DBS target showing restoration of memory loss in study 1 (fornix DBS vs. nucleus basalis of Meynert DBS) as well as the physiological brain response to DBS (neurotransmitter vs. brain activity) showing significance in study 2, will be used for study 3 and 4.

Study 1 – Selection of most optimal DBS target, behavioral tests and stimulation paradigm. In this study we will test if we are successful in restoring pharmacologically-induced memory loss with DBS in freely moving rats. For this, we will specify the most optimal stimulation paradigm for the subsequent studies. Study 2 – Selection of intracranial sampling and recording methods, neurotransmitters and brain regions. In an acute and chronic DBS experiment, we will test which intracranial sampling and recording methods can display the underlying mechanism of DBS. The stimulation paradigm and behavioral tests used in this study are based on study 1. Study 3 – DBS in a model of disease. We will investigate if DBS can also alleviate symptoms in a model of Alzheimer’s. Our findings in study 1 and 2, will guide us in choosing a suitable model of disease for this study (e.g. animal model, in which brain pathology is accompanied by a decline of a certain neurotransmitter, brain activity etc.). Moreover, the stimulation paradigm, target area and behavioral tests used in this study are based on study 1 and 2. Study 4 – Neuropharmacology. We will compare different drug treatments in conjunction with DBS. The choice of drugs is based on the results of the underlying mechanism evaluated by study 2. We will use the same intracranial sampling and recording methods that have reflected the underlying mechanism as investigated in study 2. The stimulation paradigm, target area and behavioral tests used in this study are also based on study 1 and 2

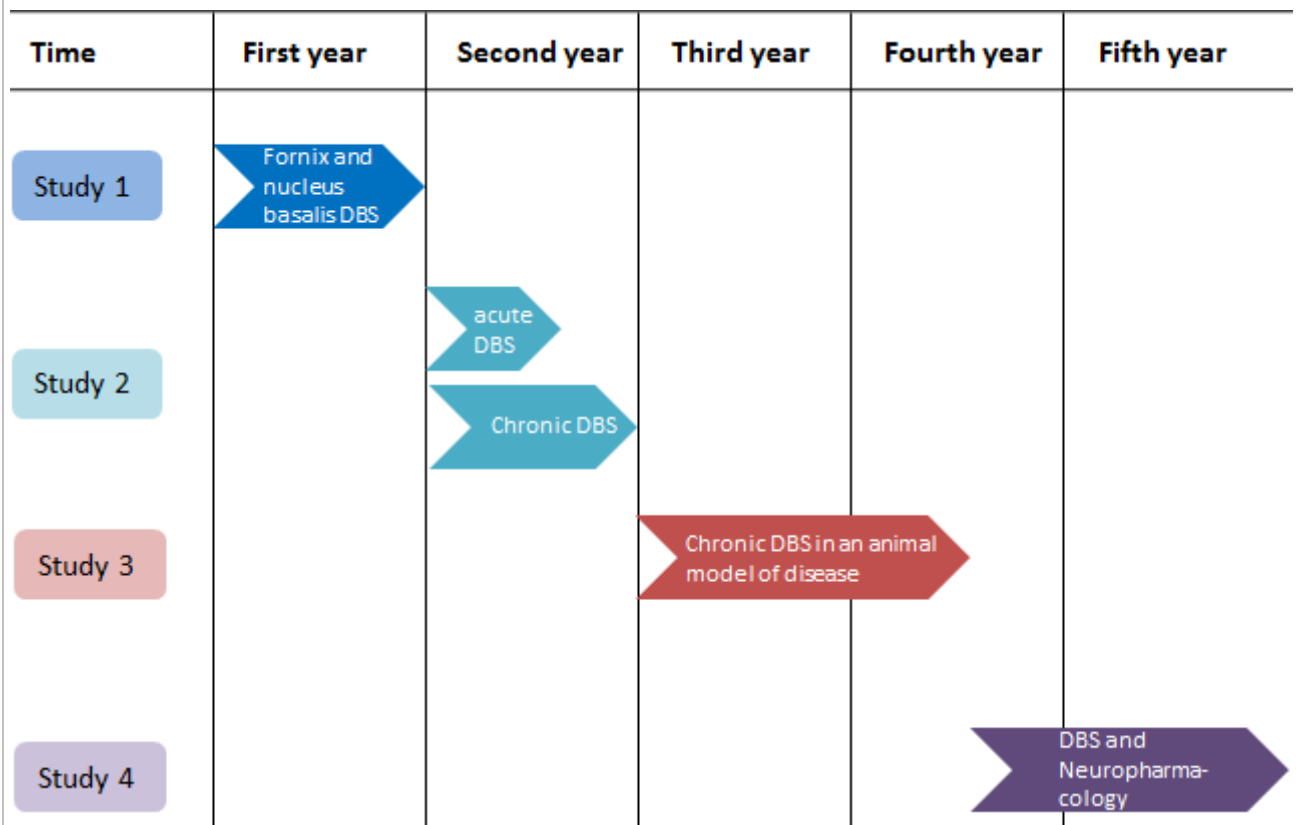


Figure 1. Summary of the studies and timeline of the research project. DBS, deep brain stimulation.

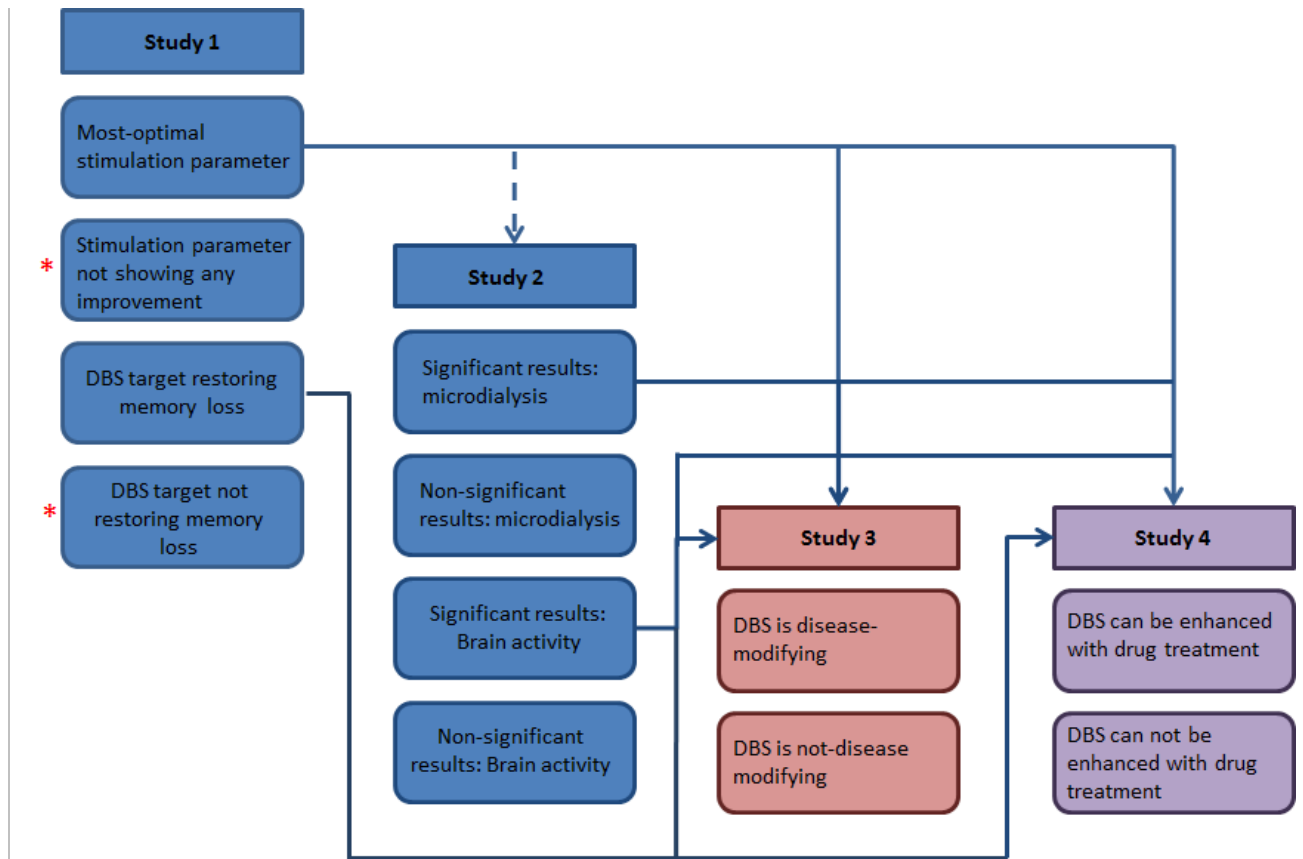


Figure 2: Go/No-go chart of project proposal. Arrows indicate “Go”-condition and * indicates a no-go condition for study 3 and 4. This means that study 1 and 2 will be carried out and only if DBS is able to restore memory loss with specific stimulation parameters, study 3 and 4 are conducted. In study 2, only the most-optimal stimulation parameter derived from study 1 is used. Microdialysis and brain activity results will provide insights in the possible mechanisms of action of DBS. Based on these findings we can select an appropriate animal model for study 3 and 4. Moreover, only the DBS target showing restoration of memory loss in study 1 (fornix DBS vs. nucleus basalis of Meynert DBS) as well as the physiological brain response to DBS (neurotransmitter vs. brain activity) showing significance in study 2, will be used for study 3 and 4.

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	The effects of fornix and nucleus basalis DBS on cognition, behaviour and neuronal networks
2	Changes in neurotransmitters and brain activation induced by acute and chronic fornix and nucleus basalis DBS
3	Long-term DBS in an animal model of disease
4	The role of neuropharmacology in DBS for dementia-related disorders
5	
6	
7	

8	
9	
10	

References

1. Denys D, Mantione M, Figuee M, van den Munckhof P, Koerselman F, Westenberg H, et al. Deep brain stimulation of the nucleus accumbens for treatment-refractory obsessive-compulsive disorder. *Archives of general psychiatry*. 2010 Oct;67(10):1061-8. PubMed PMID: 20921122. Epub 2010/10/06. eng.
2. Laxton AW, Lozano AM. Deep Brain Stimulation for the Treatment of Alzheimer Disease and Dementias. *World Neurosurgery*. 2013 9//;80(3-4):S28.e1-S.e8.
3. Hamani C, McAndrews MP, Cohn M, Oh M, Zumsteg D, Shapiro CM, et al. Memory enhancement induced by hypothalamic/fornix deep brain stimulation. *Annals of Neurology*. 2008;63(1):119-23.
4. Vignal JP, Maillard L, McGonigal A, Chauvel P. The dreamy state: hallucinations of autobiographic memory evoked by temporal lobe stimulations and seizures. *Brain : a journal of neurology*. 2007 Jan;130(Pt 1):88-99. PubMed PMID: 17142246.
5. Heschem S, Lim LW, Jahanshahi A, Steinbusch HW, Prickaerts J, Blokland A, et al. Deep brain stimulation of the forniceal area enhances memory functions in experimental dementia: the role of stimulation parameters. *Brain stimulation*. 2013 Jan;6(1):72-7. PubMed PMID: 22405739. Epub 2012/03/13. eng.
6. Laxton AW, Tang-Wai DF, McAndrews MP, Zumsteg D, Wennberg R, Keren R, et al. A phase I trial of deep brain stimulation of memory circuits in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 2010;68(4):521-34.
7. Smith GS, Laxton AW, Tang-Wai DF, McAndrews MP, Diaconescu AO, Workman CI, et al. Increased Cerebral Metabolism After 1 Year of Deep Brain Stimulation in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*. 2012:1-8.
8. Stone SSD, Teixeira CM, DeVito LM, Zaslavsky K, Josselyn SA, Lozano AM, et al. Stimulation of Entorhinal Cortex Promotes Adult Neurogenesis and Facilitates Spatial Memory. *The Journal of Neuroscience*. 2011 September 21, 2011;31(38):13469-84.
9. Suthana N, Haneef Z, Stern J, Mukamel R, Behnke E, Knowlton B, et al. Memory Enhancement and Deep-Brain Stimulation of the Entorhinal Area. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(6):502-10.
10. Kuhn J, Hardenacke K, Lenartz D, Gruendler T, Ullsperger M, Bartsch C, et al. Deep brain stimulation of the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's dementia. *Mol Psychiatry*. 2014 May 6. PubMed PMID: 24798585.
11. Heschem S, Lim L, Jahanshahi A, Blokland A, Temel Y. Deep brain stimulation in dementia-related disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2013 Dec;37(10 Pt 2):2666-75. PubMed PMID: 24060532. Epub 2013/09/26. eng.
12. Hamani C, Temel Y. Deep Brain Stimulation for Psychiatric Disease: Contributions and Validity of Animal Models. *Science Translational Medicine*. 2012 July 11, 2012;4(142):142rv8.
13. Temel Y, Tan S, Vlamings R, Sesia T, Lim LW, Lardeux S, et al. Cognitive and limbic effects of deep brain stimulation in preclinical studies. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2009;14:1891-901. PubMed PMID: 19273171. Epub 2009/03/11. eng.
14. Tan SK, Hartung H, Visser-Vandewalle V, Steinbusch HW, Temel Y, Sharp T. A combined in vivo neurochemical and electrophysiological analysis of the effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on 5-HT transmission. *Experimental neurology*. 2012 Jan;233(1):145-53. PubMed PMID: 21925498.
15. Policy Brief for Heads of Government: The Global Impact of Dementia 2013-2050. London: Alzheimer's Disease International; 2013.
16. Batsch N, Mittelman M. World Alzheimer Report 2012: Overcoming the stigma of dementia. 2012.
17. Wimo A, Prince M. World Alzheimer Report 2010: The global economic impact of dementia. London: 2010.
18. Thies W, Bleiler L. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2013 3//;9(2):208-45.
19. Kringelbach ML, Green AL, Owen SL, Schweder PM, Aziz TZ. Sing the mind electric - principles of deep brain stimulation. *Eur J Neurosci*. 2010 Oct;32(7):1070-9. PubMed PMID: 21039946.

20. Dela Cruz JA, Heschem S, Adriaanse B, Campos FL, Steinbusch HW, Rutten BP, et al. Increased number of TH-immunoreactive cells in the ventral tegmental area after deep brain stimulation of the anterior nucleus of the thalamus. *Brain Struct Funct*. 2014 Jul 30. PubMed PMID: 25074751.
21. Heschem S, Jahanshahi A, Schweimer J, Mitchell S, Carter G, Blokland A, et al. Fornix deep brain stimulation enhances acetylcholine levels in the hippocampus. *Brain, Structure and Function*. 2015;(in press).
22. Heschem S, Temel Y, Casaca-Carreira J, Arslantas K, Yakkoui Y, Blokland A, et al. A neuroanatomical analysis of the effects of a memory impairing dose of scopolamine in the rat brain using cytochrome c oxidase as principle marker. *J Chem Neuroanat*. 2014 Sep;59-60:1-7. PubMed PMID: 24768696.
23. Tan S, Vlamings R, Lim L, Sesia T, Janssen ML, Steinbusch HW, et al. Experimental deep brain stimulation in animal models. *Neurosurgery*. 2010 Oct;67(4):1073-9. PubMed PMID: 20881571. Epub 2010/10/01. eng.
24. Heschem S, Jahanshahi A, Meriaux C, Lim LW, Blokland A, Temel Y. Behavioral effects of deep brain stimulation of different areas of the Papez circuit on memory- and anxiety-related functions. *Behav Brain Res*. 2015 Jun 25;292:353-60. PubMed PMID: 26119240.



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'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.1	The effects of fornix and nucleus basalis DBS on cognition, behavior and neuronal networks

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 experimental approach of this study is to apply Deep Brain Stimulation (DBS) in the fornix and nucleus basalis of Meynert in an experimental model of memory loss, which is induced pharmacologically (e.g. intraperitoneal scopolamine injections). Consequently, we will evaluate the therapeutic effect (cognition) and side effects at different DBS settings. To identify neuronal networks that may exert these DBS effects, the intervention is preceded and followed by high resolution MR imaging.

The primary outcome of this study is to evaluate the cognitive effects and behavioral (side) effects of DBS. The readout parameter for the cognitive effect and behavioral (side) effects will vary per test and include cognition, memory, mood and anxiety. A summary of the possible different behavioral tests, readout parameters and justification is found in Table 1.

The secondary outcome of this study is to identify the neuronal networks that may exert behavioral (side) effects. The readout parameter for structural and functional connectivity of neuronal networks will entail the anatomic (re)organization of white matter tracts originating from the fornix or nucleus basalis of Meynert and resting activity related brain regions generated by diffusion tensor MRI imaging and resting state functional MRI, respectively. Moreover, proliferative cell labelling will provide insights to neurogenic processes in the hippocampus and EEG electrodes will allow us to evaluate changes in hippocampal theta rhythms during DBS on and off periods.

Though all animals will undergo behavioral tests, the selection of tests may change in the course of the study due to intermediate analyses or studies of other research groups, which were completed before ours. We will thus not use all behavioral tests as presented in Table 1, but will make a selection in the beginning of the study for follow-up studies (DBS in rats of appendix 2-4). The maximum number of

behavioral tests is 10 (5 for the domains cognition/memory and 5 for the domains anxiety/mood). The minimum number of behavioral tests is 6 (3 for each domain). However, we expect to further reduce the number of behavioral tests during the research project to a minimum of 4 and maximum of 7 behavioral tasks in appendix 2, 3 and 4. Behavioral tests that show a significant difference between the DBS on and off will be used in follow-up studies. If multiple behavioral tests are suitable and each could answer the research question of interest, we will select the test with the least degree of discomfort for following studies. Cumulative discomfort and contamination effects caused by repeated behavioral testing will be minimized by having a minimum of 24h between different tests and by starting with the behavioral task causing the least amount of discomfort (1, 2).

Table 1. Summary of the different behavioral tests and readout parameters.

Test paradigm	Item	Readout parameter	Discomfort
Barnes maze	memory	number of errors per trial, rate of decline in number of errors and path length	Mild discomfort, results in increased anxiety
Morris water maze	memory	time spent in the platform quadrant, escape latency and swimming speed	Moderate discomfort, animals will be in water
Cued and contextual fear conditioning	memory	percentage of time spent freezing and time to extinction	Moderate discomfort, small electrical shock will be administered
Object location task	memory	ratio of time spent at object in new versus old location	Mild discomfort, results in increased anxiety
Object recognition task	memory	ratio of time spent at new versus old object	Mild discomfort, results in increased anxiety
Y-maze	memory	Ratio left-right discrimination	Mild discomfort, results in increased anxiety
Skinner box paradigms e.g. reaction time and attention tasks	cognition	reaction time, incorrect responses, correct responses, premature responses	Moderate discomfort, animals will receive restricted feeding regimes or deprivation
Prepulse inhibition	cognition	startle response	Moderate discomfort, animals will temporarily be in a restrainer
Forced swim task	mood	immobility duration, latency to immobility, swimming duration, climbing duration	Moderate discomfort, animals will be in water
Sucrose intake/preference	mood	volume of sucrose intake corrected for animal weight	Mild discomfort, results in increased anxiety
Food intake	mood	volume of food intake corrected for animal weight	Moderate discomfort, animals will receive restricted feeding regimes or deprivation
Open field	anxiety and locomotion	total distance travelled, average speed and time spent in corners	Mild discomfort, results in increased anxiety
Elevated zero maze	anxiety and locomotion	total distance travelled, average speed and time spent in closed arms	Mild discomfort, results in increased anxiety
Home-cage emergency	impulsivity and anxiety	latency to escape	Mild discomfort, results in increased anxiety

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

This study is a chronic DBS experiment and entails DBS, MR imaging, EEG recordings and behavioral tests in freely moving or anaesthetized rats (rats are merely anaesthetized for MR imaging). For a summary of the experimental groups see section 2B. The procedures proposed in this study are comparable to those published in literature (3, 4) and previous studies (5-7) in which we used similar imaging methods, DBS and behavioral testing paradigms in animal models for neurodegenerative diseases.

Main study

MRI – baseline

Animals are first subjected to a baseline measurement of neuronal networks using preclinical 7 Tesla MR brain imaging under general anesthesia. An imaging protocol of about 2 hours per animal is applied to obtain high resolution anatomical T2, diffusion tensor imaging, resting state functional MRI and spectroscopy information (8). Subsequently, animals return to their home cage for a minimum of 1 week and, depending on the behavioral paradigm, they are trained for maximally 2 months and then receive brain electrodes.

Surgery and behavioral experiments

DBS electrodes are bilaterally implanted in the fornix or nucleus basalis of Meynert and an EEG electrode is placed in the hippocampus. Sham animal will undergo the same surgical procedure, but are not stimulated. In the chronic phase, animals will be subjected to behavioral tests for memory, cognition, mood and anxiety. As mentioned in section 2A, the number and choice of behavioral test may vary in course of the study, but are set at maximally 10 in the first and 7 in following studies. Behavioral tests are performed in both DBS on and off conditions. Different experimental groups consist of animals that receive high (130 Hz) and low (20 Hz) frequency DBS in different stimulation paradigms (constant, random and EEG responsive stimulation) for various time durations (maximally 24 hours per day). To be able to evaluate the effect of DBS on newly integrated neuronal networks (e.g. hippocampal neurogenesis), that are not detectable by MRI, animals will receive injections with a label that detects proliferative cells (bromodeoxyuridine, maximum 2 times a day for 5 days). To be able to evaluate the effect of DBS on changes in hippocampal theta waves, which cannot be detected by MRI, animals will undergo EEG recordings.

MRI – end

After behavioral testing, the electrode construct is removed under general anesthesia and animals are subjected to the same MRI protocol as performed at baseline. Subsequently, animals are euthanized appropriately for post-mortem analysis of the brain. Due to the possibility that the MRI scanner may not be available at our university during the study, we will consider to perform this part of the study in a different Dutch or European center with a license to perform animal experiments. Possible locations entail the University of Leuven, Gent, Utrecht or Aachen. In that case we will file a working protocol and / or an ethical application at the local facility. Based on our previous experience, we estimate a maximal experimental time of 10 months per animal.

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

To estimate the number of animals needed, we considered published studies and previous studies by our group. To minimize the number of animals used, we will perform a power analyses.

B. The animals

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

Animals

These experiments require male adult rats purchased from a registered breeding facility, as we have routinely used these animals in our previous DBS studies (5, 6, 9).

Gender

We will only use male rats, since the oestrogen cycle can interfere with the behavioral outcome and brain biochemistry, such as release of the neurotransmitters dopamine and serotonin (10). Accounting for sex as a biological variable in all biomedical research is considered fundamental for enhancing rigor and reproducibility in preclinical research. Since we have behavioral and neurochemical outcome measures, we therefore want to reduce the variability in our data by using only male rats.

Number of animals

The estimation on the total number of animals is based on our previous experience with DBS studies and a literature review. To minimize the number of animals used, we will perform a power analyses to establish the total number of animals per group and take a possible drop out of animals into account. Based on our previous experience with DBS experiments, factors such as complication of surgery, electrode loss or incorrect electrode localization will lead to a dropout of animals. Within our research group, this dropout ranges from 10% to 25% and is dependent on the duration of the experiment and animal procedures during the experiment. We thus estimate a maximum dropout of 25% and aim to reduce this number during the research project by optimizing the surgical technique and animal procedures. Considering literature and our previous experience with DBS experiments, we estimate to need a maximum of 20 animals per group for naïve rats. We will investigate 4 groups in total (see Table 2).

Power analysis: Literature review and previous experience indicate a significant effect at $\delta=0.3$ and a standard deviation of $\sigma=0.3$. The significance level is $P < 0.05$ and we require a power of $\eta=0.8$. The readout parameter for the cognitive effect and behavioral (side) effects will vary per test and include cognition, memory, mood and anxiety. A summary of the possible different behavioral tests, readout parameters and justification is found in Table 1. The readout parameter for structural and functional connectivity of neuronal networks will entail the anatomic (re)organization of white matter tracts originating from the fornix or nucleus basalis of Meynert and resting activity related brain regions generated by diffusion tensor MRI imaging and resting state functional MRI, respectively. Moreover, proliferative cell labelling will provide insights to neurogenic processes in the hippocampus and EEG electrodes will allow us to evaluate changes in hippocampal theta rhythms during DBS on and off periods.

$$N = 15.7 * (0.3/0.3)^2 = 15.7$$

Due to factors such as complication of surgery, correct electrode locations and possible electrode losses, we estimate 25% of loss per group.

$$N = 15.7 / 0.75 = 20.9 \text{ i.e. } 21 \text{ animals per group.}$$

Table 2: Number of animals needed for study 1. Different stimulation paradigms are applied to the fornix and nucleus basalis of Meynert throughout the study. A stimulation off period of at least 24h will prevent carry-over effects as described here [5]. DBS, deep brain stimulation

Study	Group	Number of animals
1 (Induced memory loss- Chronic DBS)	Fornix DBS	21
	Nucleus basalis DBS	21
	Fornix sham	21
	Nucleus basalis sham	21

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 primary aim of this study is to evaluate the cognitive effects and behavioral (side) effects of fornix and nucleus basalis of Meynert DBS. The secondary aim is to identify the neuronal networks that may exert behavioral (side) effects. These aims cannot be achieved by use of in vitro experiments or computer modelling, because these models do not allow for analysis of behavior and do not represent the organization of a complex neuronal network in a complex biological system such as the brain. In previous studies (4, 11) we have successfully shown that by using DBS in several rat models of neurodegenerative diseases, we can model the therapeutic and behavioral side effects of DBS. Though dementia research is also conducted with lower animal species such as zebrafish, drosophila and caenorhabditis elegans, the use of these animals for DBS research has several major drawbacks or is simply impossible. Due to the small size of the animal's nervous system and current spread of DBS electrodes, we cannot selectively stimulate one brain area such as the fornix or nucleus basalis of Meynert, nor can we perform behavioral tests during stimulation. Additionally, the loss of complexity in neural networks by using a lower animal species will generate research results that are less likely to be translated to humans. The current study can also not be performed in humans because of the following: 1. DBS at different (experimental) stimulation paradigms is not ethical in humans, as it is unpredictable if they may be harmful (i.e., epileptic seizures) 2. High resolution MR imaging cannot be performed after the implantation of DBS electrodes due to technical constraints and safety issues and it is ethically not accepted to remove the electrodes in patients. 3. Sham implantations of electrodes are unethical.

Reduction

We will minimize the number of animals in this study by using a power analysis. Additionally, animal numbers are minimized by the optimal study design, experience with the pharmacological-induced memory impairment model, state-of-the-art EEG measurements, imaging equipment and optimized behavioral tests after several years of experience. Moreover, only competent and trained persons will carry out the surgical procedure.

Refinement

The first study of DBS in memory-impaired animals will serve to select the behavioral tasks to use in future experiments and will therefore help to minimize the number of behavioral tasks and thus reduce animal experiment time during the research project. Finally, we will adapt the care to the need of the animals at the different stages of the experiment (e.g. recovery-food during recovery period after surgery, cage enrichment in case animals have to be single-housed, etc). Only competent and trained persons will carry out the surgical procedure.

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

Animals will be under general anesthesia during surgical procedures and will receive appropriate analgesics during the post-operative recovery period. Similarly, if animals show pain during any of the experimental procedures described, they will receive analgesics. To prevent the occurrence of more than predicted animal suffering, we will implement humane endpoints (see section J). The persons involved in this experiment possess a strong background of laboratory animal welfare experiences to minimize animal suffering, pain or fear.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

N/A

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

At the first instance we will house all animals in pairs to minimize distress. However, it is possible that rats may damage each other's electrode construct, which in turn could lead to injury, infection, and loss of the electrode construct. Consequently, this can cause a humane endpoint, euthanasia of the animal and a decrease of experimental power. This therefore introduces a consideration of animal welfare (Refinement) versus the Reduction principle of experimental animal ethics. In case only one rat pair damages each other's electrode construct, we will have to house all animals individually. However, to mitigate some of the negative consequences of individual housing, we will use enrichment objects (12).

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.

Location of MR imaging

Due to the possibility that the MRI scanner may not be available at our university during the study, we will consider to perform this part of the study in a different Dutch or European center with a license to perform animal experiments. Possible locations entail the University of Leuven, Gent, Utrecht or Aachen. In that case we will file a working protocol and / or an ethical application at the local facility.

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

Local rules of housing, care and treatment will apply.

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.

General anesthesia will be used for surgical procedures and imaging procedures. Animals will be monitored daily during the experimental procedures stated in section 2A and will be checked for signs of pain or discomfort. Analgesics will be applied to relief suffering e.g. during the pre-, peri- and post-

surgical recovery period. Treatment of pain or suffering will be conducted according to the recommendations of GV-SOLAS: Pain management for laboratory animals (May 2015).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Possible adverse effects which might occur are experience of stress.

Explain why these effects may emerge.

The electrode construct is cemented on the skull of the animal. In the postoperative period the headskin of the animal will heal and grow around the electrode construct. However loss of the electrode construct may still occur due to suboptimal healing of head skin around the construct or mechanical stress during behavioral testing. Animals might also experience stress due to injections of labelling proteins for newly born cells and brain stimulation might induce stress, tingling sensation and balance problems.

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

Animals will be visually inspected daily during experiments. Loss of an electrode construct during the postoperative period or behavioral testing is prevented by the extensive experience in behavioral testing and refinement of surgical techniques performed by our research group over the past 10 years. This has recently led to some detailed changes such as bending the DBS cables along the axis of the animal and using sufficiently high cages during behavioral testing. Additionally, completely drying the skull during stereotactic surgery and working aseptically will minimize electrode loss. Stress due to injections will be minimized by skilled injection techniques and handling of the animals. Animals that experience acute adverse effects caused by DBS during behavioral testing (e.g. seizure), will be released from the stimulation immediately (DBS turned off).

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 will be based on considerations regarding general health, severe weight loss (20% body weight loss when compared to the pre-study weight), infections, loss of electrode construct and animal behavior.

Indicate the likely incidence.

We estimate the likely incidence of implementing a humane endpoint at maximally 15%. In the course of this research proposal we will optimize surgical and animal procedures to reduce this 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').

- Behavioral tests: Moderate discomfort. See table 1.
- MRI imaging: mild discomfort, due to anesthesia and relocation of animals
- Stereotactic surgery: moderate discomfort due to surgery
- DBS and EEG measurements: mild discomfort due to new environment
- Possibility of individual housing: moderate discomfort due to non-social behavior
- Injections: mild discomfort, can result in increased stress/anxiety
- Euthanasia: mild discomfort, due to anesthesia

Cumulative discomfort: 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.

At the end of the experiments, all animals will be euthanized to isolate the brain and perform histologic analysis. Histologic analysis of the brain is needed to check for the correct electrode localization and to study the neuroanatomical effects of DBS and correlate this to behavioral outcome.

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

References

1. Blokland A, Ten Oever S, van Gorp D, van Draanen M, Schmidt T, Nguyen E, et al. The use of a test battery assessing affective behavior in rats: order effects. *Behavioural brain research*. 2012;228(1):16-21.
2. McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiology & behavior*. 2001;73(5):705-17.
3. Tan S, Vlamings R, Lim L, Sesia T, Janssen ML, Steinbusch HW, et al. Experimental deep brain stimulation in animal models. *Neurosurgery*. 2010;67(4):1073-9.
4. Temel Y, Tan S, Vlamings R, Sesia T, Lim LW, Lardeux S, et al. Cognitive and limbic effects of deep brain stimulation in preclinical studies. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2009;14:1891-901.
5. Heschem S, Jahanshahi A, Meriaux C, Lim LW, Blokland A, Temel Y. Behavioral effects of deep brain stimulation of different areas of the Papez circuit on memory- and anxiety-related functions. *Behavioural brain research*. 2015;292:353-60.
6. Heschem S, Lim LW, Jahanshahi A, Steinbusch HW, Prickaerts J, Blokland A, et al. Deep brain stimulation of the fornical area enhances memory functions in experimental dementia: the role of stimulation parameters. *Brain stimulation*. 2013;6(1):72-7.
7. Stone SSD, Teixeira CM, DeVito LM, Zaslavsky K, Josselyn SA, Lozano AM, et al. Stimulation of Entorhinal Cortex Promotes Adult Neurogenesis and Facilitates Spatial Memory. *The Journal of Neuroscience*. 2011;31(38):13469-84.
8. Jansen JF, Lemmens EM, Strijkers GJ, Prompers JJ, Schijns OE, Kooi ME, et al. Short- and long-term limbic abnormalities after experimental febrile seizures. *Neurobiology of disease*. 2008;32(2):293-301.
9. Heschem S, Jahanshahi A, Schweimer J, Mitchell S, Carter G, Blokland A, et al. Fornix deep brain stimulation enhances acetylcholine levels in the hippocampus. *Brain, Structure and Function*. 2015;(in press).
10. Barth C, Villringer A, Sacher J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Frontiers in neuroscience*. 2015;9:37.
11. Hamani C, Temel Y. Deep Brain Stimulation for Psychiatric Disease: Contributions and Validity of Animal Models. *Science Translational Medicine*. 2012;4(142):142rv8.
12. Van Loo PL, Van de Weerd HA, Van Zutphen LF, Baumans V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Laboratory animals*. 2004;38(2):178-88.



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'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 3.4.4.2	Type of animal procedure Changes in neurotransmitters and brain activation induced by acute and chronic fornix and nucleus basalis DBS

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 **experimental design** of this study is an **evaluation of DBS intervention**. We will evaluate the changes in neurotransmitters and brain activation induced by acute and chronic DBS.

The primary aim of this study is to identify the changes in neurotransmitters induced by acute and chronic DBS. The readout parameter will entail the change in neurotransmitter levels in the hippocampus during acute DBS under general anesthesia and chronic DBS during behavioral testing. To quantify the level of neurotransmitters we will use intracranial sampling methods such as microdialysis.

The secondary aim of this study is to identify the changes in brain activation induced by acute and chronic DBS. The readout parameter for brain activation will entail the change in local field potentials in the hippocampus measured by intracranial electrophysiology recordings and the activity change in specific brain regions measured by PET-CT imaging. We will also use fiber photometry in order to quantify region-specific changes in Calcium influx.

We justify the choice for these intracranial sampling and recordings methods, because in previous studies we have shown that these methods can identify DBS induced changes of neurotransmitter levels and brain region activation. We also expect DBS-related changes in Calcium influx in specific brain region targets like the hippocampus. This has led to the validation of several experimental animal models and new insights in to the mechanism of action of DBS in animal models for neurodegenerative diseases [1-

4].

Table 1. Summary of the different behavioral tests and readout parameters.

Test paradigm	Item	Readout parameter	Discomfort
Barnes maze	memory	number of errors per trial, rate of decline in number of errors and path length	Mild discomfort, results in increased anxiety
Morris water maze	memory	time spent in the platform quadrant, escape latency and swimming speed	Moderate discomfort, animals will be in water
Cued and contextual fear conditioning	memory	percentage of time spent freezing and time to extinction	Moderate discomfort, small electrical shock will be administered
Object location task	memory	ratio of time spent at object in new versus old location	Mild discomfort, results in increased anxiety
Object recognition task	memory	ratio of time spent at new versus old object	Mild discomfort, results in increased anxiety
Y-maze	memory	Ratio left-right discrimination	Mild discomfort, results in increased anxiety
Skinner box paradigms e.g. reaction time and attention tasks	cognition	reaction time, incorrect responses, correct responses, premature responses	Moderate discomfort, animals will receive restricted feeding regimes or deprivation
Prepulse inhibition	cognition	startle response	Moderate discomfort, animals will temporarily be in a restrainer
Forced swim task	mood	immobility duration, latency to immobility, swimming duration, climbing duration	Moderate discomfort, animals will be in water
Sucrose intake/preference	mood	volume of sucrose intake corrected for animal weight	Mild discomfort, results in increased anxiety
Food intake	mood	volume of food intake corrected for animal weight	Moderate discomfort, animals will receive restricted feeding regimes or deprivation
Open field	anxiety and locomotion	total distance travelled, average speed and time spent in corners	Mild discomfort, results in increased anxiety
Elevated zero maze	anxiety and locomotion	total distance travelled, average speed and time spent in closed arms	Mild discomfort, results in increased anxiety
Home-cage emergency	impulsivity and anxiety	latency to escape	Mild discomfort, results in increased anxiety

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

This study is an acute and chronic DBS experiment that entails DBS, EEG registrations, behavioral testing and intracranial sampling and recording methods under general anesthesia and in freely moving rats during behavioral testing, followed by PET-CT imaging.

Acute DBS

This is a terminal experiment for acute DBS. DBS electrodes are implanted by stereotactic brain surgery (see appendix 1 and SOP 1). We will only use naïve rats and perform DBS or sham operation. In the same session under general anesthesia, we will insert the microdialysis, optical fiber or electrophysiology probes. In case of fiber photometry, a virus (AAV-GCamP) will be injected into the brain target 4 weeks prior to DBS surgery. Neurotransmitter sampling is performed in both DBS on and off stimulation settings. Since it is not possible to combine microdialysis with electrophysiology/viral delivery for fiber photometry, we will divide the animals into two groups: Neurotransmitter (NT) and brain activity (BA) group, respectively. Moreover, since this is an acute experiment to evaluate immediate brain responses to DBS, behavioral tests are not performed and thus no pharmacologically-induced memory impairment is needed. At the end of each experiment, rats are euthanized and the brain is removed for further histological analyses.

Chronic DBS

Similar to the study described in appendix 1, this is a chronic DBS experiment. We define chronic DBS as stimulation for maximally 24 hours per day for at least 4 weeks per animal [16] with a maximal experimental duration of 10 months. We will use naïve animals, whereas memory impairment will be induced pharmacologically for behavioral testing. DBS electrodes are implanted by stereotactic brain surgery under general anesthesia (see appendix 1). Additionally, intracranial sampling probes for fiber photometry or microdialysis are implanted. Similar to study 1, behavioral tests in DBS on and off conditions will be performed, but this time only the most optimal stimulation parameter derived from study 1 will be used. The expected minimum number of behavioral tests is 4 and the maximum number of behavioral tests is 7. Since this study investigates the mechanisms of action of the most optimal stimulation parameters for both DBS target structures, sampling of neurotransmitters will be performed during behavioral testing and calcium flux is measured through fiber photometry probes. Then, similar to the acute DBS experiment, electrophysiological recordings of brain activity are performed under general anesthesia in DBS on and off conditions. Half of the total number of animals is used for intracranial sampling recordings, the other half receive an intraperitoneal or intravenous injected tracer (tracer for different neurotransmitter systems will be defined based on the results of the acute experiment, or otherwise indicate glucose metabolism) for PET-CT imaging in DBS on and off conditions under general anesthesia. Subsequently, all rats are euthanized and the brain is removed for further histological processing.

Since this study contains a chronic DBS experiment similar to appendix 1, we estimate a maximal experimental duration time of 10 months per animal.

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

We have based the number of animals on literature review, previous studies performed by our research group and a power analyses. The power analyses is presented in section 2B.

B. The animals

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

Animals

These experiments require male adult rats purchased from a registered breeding facility, as we have routinely used these animals in our previous DBS studies [1-3].

Gender

We will only use male rats, since the oestrogen cycle can interfere with the behavioral outcome and brain biochemistry, such as release of the neurotransmitters dopamine and serotonin [4]. Accounting for sex as a biological variable in all biomedical research is considered fundamental for enhancing rigor and reproducibility in preclinical research. Since we have behavioral and neurochemical outcome measures, we therefore want to reduce the variability in our data by using only male rats.

Number of animals

The estimation on the total number of animals is based on the study described in appendix 1 and our previous experience with DBS and intracranial sampling and recording methods. We estimate to need 14 animals per group for the acute and 20 for the chronic DBS experiment. The acute and chronic DBS experiment will contain groups of rats with DBS or sham for two brain targets.

Power analysis: Literature review and previous experience indicate a significant effect at $\delta=0.3$. Because the primary readout parameters differ between the acute and chronic studies, we estimate the standard deviation for the acute experiment to be $\sigma=0.25$ and for the chronic $\sigma=0.3$. The significance level is $P < 0.05$ and we require a power of $\eta=0.8$. The readout parameter will entail the change in neurotransmitter levels in the hippocampus during acute DBS under general anesthesia and chronic DBS during behavioral testing. The readout parameter for brain activation will entail the change in local field potentials in the hippocampus measured by intracranial electrophysiology recordings and the activity change in specific brain regions measured by PET-CT imaging. We will also use fiber photometry in order to quantify region-specific changes in Calcium influx.

Acute experiment:

$$N = 15.7 * (0.25/0.3)^2 = 10.9$$

In the acute experiment, we estimate that factors such as complication of surgery and correct electrode locations will lead to 20% of loss per group.

$$N = 10.9 / 0.8 = 13.6 \text{ i.e. } 14 \text{ animals per group.}$$

Chronic experiment:

$$N = 15.7 * (0.3/0.3)^2 = 15.7$$

In the chronic study, besides factors such as complication of surgery and correct electrode locations we also have to consider possible electrode losses. Therefore, we estimate 25% of loss per group for the chronic study.

$$N = 15.7 / 0.75 = 20.9 \text{ i.e. } 21 \text{ animals per group.}$$

Table 2: Number of animals needed in study 2. DBS, deep brain stimulation; NT, to study neurotransmitter changes; BA, to study changes in brain activity.

Study	Group	Number of animals
2A (Mechanism of action: acute DBS)	NT Fornix DBS	14
	NT Nucleus basalis DBS	14
	NT Fornix sham	14
	NT Nucleus basalis sham	14
	BA Fornix DBS	14
	BA Nucleus basalis DBS	14
	BA Fornix sham	14
	BA Nucleus basalis sham	14
2B (Mechanism of action: chronic DBS)	NT Fornix DBS	21
	NT Nucleus basalis DBS	21
	NT Fornix sham	21
	NT Nucleus basalis sham	21
	BA Fornix DBS	21
	BA Nucleus basalis DBS	21
	BA Fornix sham	21
	BA Nucleus basalis sham	21

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 primary and secondary aims of this study, respectively, are to identify the changes in neurotransmitters and brain activation induced by acute and chronic DBS. These aims cannot be achieved by use of in vitro experiments, computer modelling or lower animal species because these models do not allow for analysis of neurotransmitters or measuring brain activation in a neural network. The current study can also not be performed in humans because of the following: 1. Studying the neurochemical effects of DBS in healthy humans is not ethical 2. We cannot continuously sample neurotransmitters and or record from different brain regions through intracranial probes in a non-invasive way.

Reduction

The number of animals in this study is based on appendix 1 and experience from previous studies. Only competent and trained persons will carry out the surgical procedure. For the acute experiment we have reduced the number of animals because this is a terminal experiment. We thus do not have to correct for the loss of animals due to the loss of electrode construct. For the chronic experiment we will use the same number of animals as described in appendix 1. Though study 1 and 2 both entail a chronic DBS experiment in memory-impaired rats, we have chosen to not combine these studies. Study 1 will serve to select the optimal stimulation paradigm and identify the effect on neuronal networks. Moreover, the intracranial sampling methods will implement an ipsilateral lesion to the brain tissue, thus making histology and MR imaging impossible in study 1. The studies are therefore carried out separately.

Refinement

By the experience gained in study 1, we will select the behavioral tests and most optimal stimulation parameter to use in the chronic DBS experiment described in section A. Reduction of number of behavioral test will reduce animal discomfort. Similar to study 1, we will adapt the accommodation and the care to the need of the animals. Moreover, only competent and trained persons will carry out the surgical procedure. We will implement humane endpoints.

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

Animals will be under general anesthesia during surgical procedures and will receive appropriate analgesics during the post-operative recovery period. Similarly, if animals show pain during any of the experimental procedures described, they will receive analgesics. To prevent the occurrence of more than predicted animal suffering, we will implement humane endpoints. The persons involved in this experiment possess a strong background of laboratory animal welfare experiences to minimize animal suffering, pain or fear. Furthermore, all materials derived from the experiments involving GMO's will be dealt with appropriately.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

N/A

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

At the first instance we will house all animals in pairs to minimize distress. However, it is possible that rats may damage each other's electrode construct, which in turn could lead to injury, infection, and loss of the electrode construct. Consequently, this can cause a humane endpoint, euthanasia of the animal and a decrease of experimental power. This therefore introduces a consideration of animal welfare (Refinement) versus the Reduction principle of experimental animal ethics. In case only one rat pair damages each other's electrode construct, we will have to house all animals individually. However, to mitigate some of the negative consequences of individual housing, we will use enrichment objects [5].

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.

Local rules of housing, care and treatment will apply.

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.

General anesthesia will be used for surgical procedures and imaging procedures. Animals will be monitored daily during the experimental procedures stated in section 2A and will be checked for signs of pain or discomfort. Analgesics will be applied to relieve suffering e.g. during the pre-, peri- and post-surgical recovery period. Treatment of pain or suffering will be conducted according to the recommendations of GV-SOLAS: Pain management for laboratory animals (May 2015).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Similar to study 1, we will implant an electrode construct on the skull of the animal. The adverse effects and management of these are thus identical as described in appendix 1. However, in this study, we will additionally implant intracranial probes in the brain and inject AAV-GCaMP, which raises the risk for

infection.

Explain why these effects may emerge.

Implanted probes increase the risk for infection.

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

Animals will be visually inspected daily during experiments. Loss of an electrode construct during the postoperative period or behavioral testing and the likelihood of infection is prevented by the extensive experience in behavioral testing and refinement of surgical techniques performed by our research group over the past 10 years. This has recently led to some detailed changes such as bending the DBS cables along the axis of the animal and using sufficiently high cages during behavioral testing. Additionally, completely drying the skull during stereotactic surgery and working aseptic will minimize electrode loss and infections. Stress due to injections will be minimized by skilled injection techniques and handling of the animals. Animals that experience acute adverse effects caused by DBS during behavioral testing (e.g. seizure), will be released from the stimulation immediately (DBS turned off).

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 will be based on considerations regarding general health, severe weight loss (20% body weight loss when compared to the pre-study weight), infections, loss of electrode and probe construct and animal behavior considering the model.

Indicate the likely incidence.

We estimate the likely incidence of implementing a humane endpoint at maximally 15%. However, the study of DBS in naïve animals described in appendix 1 is carried out during which we will optimize surgical and animal procedures to reduce this 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').

25% of the animals will experience non-recovery.

75% of the animals will experience moderate discomfort.

Acute DBS experiment:

- NT: non-recovery

- BA: Stereotactic surgery for virus injection 4 weeks prior to experiment: moderate discomfort due to surgery

Chronic DBS experiment

- Behavioral tests: Mild to moderate discomfort. See table 1 of appendix 1.

- Stereotactic surgery: moderate discomfort due to surgery.

- DBS and EEG measurements: mild discomfort due to new environment.

- Possible individual housing: moderate discomfort due to non-social behavior

- Euthanasia: mild discomfort, due to anesthesia.

- PET imaging: mild discomfort, due to stress of relocation of animals.

Cumulative discomfort for acute and chronic experiments: 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.

At the end of the experiments, all animals will be euthanized to isolate the brain and perform histologic analysis. Histologic analysis of the brain is needed to check for the correct electrode localization and to study the neuroanatomical effects of DBS and correlate this to behavioral outcome.

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

References

1. Blokland A, Ten Oever S, van Gorp D, van Draanen M, Schmidt T, Nguyen E, et al. The use of a test battery assessing affective behavior in rats: order effects. *Behavioural brain research*. 2012 Mar 1;228(1):16-21. PubMed PMID: 22173002.
2. McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiology & behavior*. 2001 Aug;73(5):705-17. PubMed PMID: 11566205.
3. Tan S, Vlamings R, Lim L, Sesia T, Janssen ML, Steinbusch HW, et al. Experimental deep brain stimulation in animal models. *Neurosurgery*. 2010 Oct;67(4):1073-9. PubMed PMID: 20881571. Epub 2010/10/01. eng.
4. Temel Y, Tan S, Vlamings R, Sesia T, Lim LW, Lardeux S, et al. Cognitive and limbic effects of deep brain stimulation in preclinical studies. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2009;14:1891-901. PubMed PMID: 19273171. Epub 2009/03/11. eng.
5. Heschem S, Jahanshahi A, Meriaux C, Lim LW, Blokland A, Temel Y. Behavioral effects of deep brain stimulation of different areas of the Papez circuit on memory- and anxiety-related functions. *Behavioural brain research*. 2015 Jun 25;292:353-60. PubMed PMID: 26119240.
6. Heschem S, Lim LW, Jahanshahi A, Steinbusch HW, Prickaerts J, Blokland A, et al. Deep brain stimulation of the fornix area enhances memory functions in experimental dementia: the role of stimulation parameters. *Brain stimulation*. 2013 Jan;6(1):72-7. PubMed PMID: 22405739. Epub 2012/03/13. eng.
7. Stone SSD, Teixeira CM, DeVito LM, Zaslavsky K, Josselyn SA, Lozano AM, et al. Stimulation of Entorhinal Cortex Promotes Adult Neurogenesis and Facilitates Spatial Memory. *The Journal of Neuroscience*. 2011 September 21, 2011;31(38):13469-84.
8. Jansen JF, Lemmens EM, Strijkers GJ, Prompers JJ, Schijns OE, Kooi ME, et al. Short- and long-term limbic abnormalities after experimental febrile seizures. *Neurobiology of disease*. 2008 Nov;32(2):293-301. PubMed PMID: 18707002.
9. Heschem S, Jahanshahi A, Schweimer J, Mitchell S, Carter G, Blokland A, et al. Fornix deep brain stimulation enhances acetylcholine levels in the hippocampus. *Brain, Structure and Function*. 2015;(in press).
10. Barth C, Villringer A, Sacher J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Frontiers in neuroscience*. 2015;9:37. PubMed PMID: 25750611. Pubmed Central PMCID: 4335177.
11. Hamani C, Temel Y. Deep Brain Stimulation for Psychiatric Disease: Contributions and Validity of Animal Models. *Science Translational Medicine*. 2012 July 11, 2012;4(142):142rv8.
12. Bartolomucci A, Palanza P, Gaspani L, Limiroli E, Panerai AE, Ceresini G, et al. Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependent. *Physiology & behavior*. 2001 Jun;73(3):401-10. PubMed PMID: 11438368.
13. Ferrari PF, Palanza P, Parmigiani S, Rodgers RJ. Interindividual variability in Swiss male mice: relationship between social factors, aggression, and anxiety. *Physiology & behavior*. 1998 Mar;63(5):821-7. PubMed PMID: 9618005.
14. Teather LA, Magnusson JE, Chow CM, Wurtman RJ. Environmental conditions influence hippocampus-dependent behaviours and brain levels of amyloid precursor protein in rats. *The European journal of neuroscience*. 2002 Dec;16(12):2405-15. PubMed PMID: 12492435.

15. Van Loo PL, Van de Weerd HA, Van Zutphen LF, Baumans V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Laboratory animals*. 2004 Apr;38(2):178-88. PubMed PMID: 15070458.

16. Jahanshahi A, Schonfeld L, Janssen ML, Heschem S, Kocabicak E, Steinbusch HW, et al. Electrical stimulation of the motor cortex enhances progenitor cell migration in the adult rat brain. *Exp Brain Res*. 2013;231(2):165-77.

1. Heschem S, Jahanshahi A, Meriaux C, Lim LW, Blokland A, Temel Y. Behavioral effects of deep brain stimulation of different areas of the Papez circuit on memory- and anxiety-related functions. *Behavioural brain research*. 2015;292:353-60.

2. Heschem S, Jahanshahi A, Schweimer J, Mitchell S, Carter G, Blokland A, et al. Fornix deep brain stimulation enhances acetylcholine levels in the hippocampus. *Brain, Structure and Function*. 2015;(in press).

3. Heschem S, Lim LW, Jahanshahi A, Steinbusch HW, Prickaerts J, Blokland A, et al. Deep brain stimulation of the forniceal area enhances memory functions in experimental dementia: the role of stimulation parameters. *Brain stimulation*. 2013;6(1):72-7.

4. Barth C, Villringer A, Sacher J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Frontiers in neuroscience*. 2015;9:37.

5. Van Loo PL, Van de Weerd HA, Van Zutphen LF, Baumans V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Laboratory animals*. 2004;38(2):178-88.



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'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3.4.4.3	Type of animal procedure Long-term DBS in an animal model of disease

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The experimental design of this study is to evaluate deep brain stimulation (DBS) of the fornix or nucleus basalis of Meynert in an animal model of disease. We will evaluate the long-term effects on cognition and (behavioural) side effects. Our findings in study 1 and 2, will guide us in choosing a suitable model of disease for the present study (e.g. animal model, in which brain pathology is accompanied by a decline of a certain neurotransmitter, change in brain activity etc.). This means that the outcomes of study 1 and 2 are essential to predict in which type of dementia DBS can help to alleviate symptoms. Possible choices are transgenic Alzheimer rats or immunotoxin-mediated rat models of dementia (1).

The aim of this study is to evaluate whether DBS is disease-modifying, i.e. whether DBS can have an effect on brain pathology and slow down the progression of memory loss. For this, we will first evaluate cognitive effects and behavioral (side) effects of DBS in a long-term study. The readout parameters for behavioral side effects and the cognitive effect are dependent on the results of the study described in appendix 1. These will entail readout parameters generated by the specific behavioral tests, EEG and fiber photometry recordings that have successfully shown the changes in cognition and behavior in these studies. The readout parameter for the effects on AD brain pathology will entail the anatomic (re)organization of white matter tracts originating from the fornix or nucleus basalis of Meynert and resting activity related brain regions generated by diffusion tensor MRI imaging and resting state functional MRI, respectively. After sacrificing the animals, brains will be thoroughly screened with post-mortem (immuno)histochemistry in order to further evaluate the effects of DBS on brain pathology.

Table 1. Summary of the different behavioral tests and readout parameters.

Test paradigm	Item	Readout parameter	Discomfort
Barnes maze	memory	number of errors per trial, rate of decline in number of errors and path length	Mild discomfort, results in increased anxiety
Morris water maze	memory	time spent in the platform quadrant, escape latency and swimming speed	Moderate discomfort, animals will be in water
Cued and contextual fear conditioning	memory	percentage of time spent freezing and time to extinction	Moderate discomfort, small electrical shock will be administered
Object location task	memory	ratio of time spent at object in new versus old location	Mild discomfort, results in increased anxiety
Object recognition task	memory	ratio of time spent at new versus old object	Mild discomfort, results in increased anxiety
Y-maze	memory	Ratio left-right discrimination	Mild discomfort, results in increased anxiety
Skinner box paradigms e.g. reaction time and attention tasks	cognition	reaction time, incorrect responses, correct responses, premature responses	Moderate discomfort, animals will receive restricted feeding regimes or deprivation
Prepulse inhibition	cognition	startle response	Moderate discomfort, animals will temporarily be in a restrainer
Forced swim task	mood	immobility duration, latency to immobility, swimming duration, climbing duration	Moderate discomfort, animals will be in water
Sucrose intake/preference	mood	volume of sucrose intake corrected for animal weight	Mild discomfort, results in increased anxiety
Food intake	mood	volume of food intake corrected for animal weight	Moderate discomfort, animals will receive restricted feeding regimes or deprivation
Open field	anxiety and locomotion	total distance travelled, average speed and time spent in corners	Mild discomfort, results in increased anxiety
Elevated zero maze	anxiety and locomotion	total distance travelled, average speed and time spent in closed arms	Mild discomfort, results in increased anxiety
Home-cage emergency	impulsivity and anxiety	latency to escape	Mild discomfort, results in increased anxiety

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

This study is a long-term DBS experiment (max. experimental duration of 10 months) and entails DBS, MR imaging, microdialysis, fiber photometry and behavioral tests in freely moving or anaesthetized rats

(as described under point 1.3 Surgery and behavioral experiments). For a summary of the experimental groups see section 2B. The procedures proposed in this study are comparable to those published in literature (2, 3) and previous studies (4-6) in which we used similar imaging methods, DBS and behavioral testing paradigms in animal models for neurodegenerative diseases (either transgenic or immunotoxin-mediated rat models of Alzheimer's).

MRI – baseline

Animals are first subjected to a baseline measurement of neuronal networks using preclinical 7 Tesla MR brain imaging under general anesthesia. An imaging protocol of about 2 hours per animal is applied to obtain high resolution anatomical T2, diffusion tensor imaging, resting state functional MRI and spectroscopy information (7). Subsequently, animals return to their home cage for a minimum of 1 week and, depending on the behavioral paradigm, they are trained for maximally 2 months and then receive brain electrodes.

Surgery and behavioral experiments

DBS electrodes are bilaterally implanted in the fornix or nucleus basalis of Meynert. An EEG electrode is implanted in the hippocampus. Sham animals will undergo the same surgical procedure, but are not stimulated. In the chronic phase, animals will be subjected to behavioral tests for memory, cognition, mood and anxiety. The number and choice of behavioral test as well as stimulation parameters will depend on the outcomes of study 1. Behavioral tests are performed in both DBS on and off conditions and stimulation paradigms (constant, random and EEG responsive stimulation) are applied for maximally 24 hours per day. Next, depending on the outcomes of study 2, we want to measure mechanisms of action in DBS on and off conditions. This can be related to microdialysis, fiber photometry or both. To be able to evaluate the effect of DBS on newly integrated neuronal networks (e.g. hippocampal neurogenesis), that are not detectable by MRI, animals will receive injections with a label that detects proliferative cells (bromodeoxyuridine, maximum 2 times a day for 5 days). To be able to evaluate the effect of DBS on changes in hippocampal theta waves, which cannot be detected by MRI, animals will undergo EEG recordings.

MRI – end

After behavioral testing, the electrode construct is removed under general anesthesia and animals are subjected to the same MRI protocol as performed at baseline. Subsequently, animals are euthanized appropriately for post-mortem analysis of the brain.

Location of MR imaging

Due to the possibility that the MRI scanner may not be available at our university during the study, we will consider to perform this part of the study in a different Dutch or European center with a license to perform animal experiments. Possible locations entail the University of Leuven, Gent, Utrecht or Aachen. In that case we will file a working protocol and / or an ethical application at the local facility. Based on our previous experience, we estimate a maximal experimental time of 10 months per animal.

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

We have based the number of animals on literature review, previous studies performed by our research group and a power analyses. The power analyses is presented in section 2B.

B. The animals

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

Animals

These experiments require male adult rats with AD-like pathology or naïve animals (controls) purchased from a registered breeding facility. Our findings in study 1 and 2, will guide us in choosing a suitable model of disease for the present study (e.g. animal model, in which brain pathology is accompanied by a decline of a certain neurotransmitter, etc.). This means that the outcomes of study 1 and 2 are essential to predict in which type of dementia DBS can help to alleviate symptoms. For this, we will choose an AD

model with the least degree of discomfort, which can answer our research question. Considering animal welfare, it is known that rats with genetically- or chemically-induced AD-like pathology suffer from (progressive) cognitive impairment (8, 9). Contrary to this, basic neurological features such as righting response after being placed on the dorsal side, eye blink, ear twitch, and limb withdrawal in response to tactile stimuli, orienting response to a visual stimuli, startle response following an auditory stimulus, weight and feeding behavior seem to be comparable to age-matched wild-type rats (10, 11). It is difficult to predict the effects on an individual animal, so genetically engineered or immunotoxin-induced animals will be monitored closely to mitigate any unanticipated welfare concerns as they arise.

Gender

We will only use male rats, since the oestrogen cycle can interfere with the behavioral outcome and brain biochemistry, such as release of the neurotransmitters dopamine and serotonin (12). Accounting for sex as a biological variable in all biomedical research is considered fundamental for enhancing rigor and reproducibility in preclinical research. Since we have behavioral and neurochemical outcome measures, we therefore want to reduce the variability in our data by using only male rats.

Number of animals

The estimation on the total number of animals is based on the studies described in appendix 1 and 2 and our previous experience with DBS. This means that results of study 1 and 2 might lead to the exclusion of a DBS group together with its corresponding sham, if it was not able to restore memory loss based on behavioral and physiological parameters. Since we are investigating the potency DBS to reduce side effects and increase the cognitive effect in an animal model of disease, we foresee a larger dropout rate than in study 1 and 2. We therefore estimate to need 22 per group for Alzheimer rats and 16 animals per group for naïve controls (no surgery; we want to investigate whether the memory performance of DBS AD rats is comparable to healthy controls). In total we will have a maximum of 9 groups, DBS and sham stimulation in Alzheimer rats and one control group (see table 2).

Power analysis: Literature review and previous experience indicate a significant effect at $\delta=0.3$ and a standard deviation of $\sigma=0.3$. The significance level is $P < 0.05$ and we require a power of $\eta=0.8$. The readout parameters for behavioral side effects and the cognitive effect are dependent on the results of the study described in appendix 1. These will entail readout parameters generated by the specific behavioral tests, EEG and fiber photometry recordings that have successfully shown the changes in cognition and behavior in these studies. The readout parameter for the effects on AD brain pathology will entail the anatomic (re)organization of white matter tracts originating from the fornix or nucleus basalis of Meynert and resting activity related brain regions generated by diffusion tensor MRI imaging and resting state functional MRI, respectively. After sacrificing the animals, brains will be thoroughly screened with post-mortem (immuno)histochemistry in order to further evaluate the effects of DBS on brain pathology.

$$N = 15.7 * (0.3/0.3)^2 = 15.7$$

Due to factors such as complication of surgery, correct electrode locations, possible electrode losses and additional dropout due to the disease model, we estimate 35% of loss per group.

$$N = 15.7 / 0.65 = 24.2 \text{ e.g. } 25 \text{ animals per group.}$$

Control animals are naïve rats and will not receive any electrodes, so we do not expect any complication factors.

Table 2: Number of animals needed for study 3. Please note that results of study 1 and 2 might lead to the exclusion of a DBS group together with its corresponding sham, if it was not able to restore memory loss based on behavioral and physiological parameters. Only the most-optimal stimulation parameter derived from study 1 is used here. Control rats are wild-type rats without AD pathology and without DBS. DBS, deep brain stimulation. NT, to study neurotransmitter changes; BA, to study changes in brain activity.

Study	Group	Number of animals
3 (AD-Chronic DBS)	NT AD rat fornix DBS	25
	NT AD rat nucleus basalis DBS	25
	NT AD rat fornix sham	25
	NT AD rat nucleus basalis sham	25
	BA AD rat fornix DBS	25
	BA AD rat nucleus basalis DBS	25
	BA AD rat fornix sham	25
	BA AD rat nucleus basalis sham	25
	control	16

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 primary and secondary aims of this study, respectively, are to investigate DBS induced cognitive and behavioral side effects in an animal model of disease and to evaluate the underlying mechanism. These aims can only be achieved when using the same experimental procedures as used in appendix 1 and 2, since the methods used in this study are dependent on these studies. These aims cannot be achieved by use of in vitro experiments, computer modelling, lower animal species because these systems do not represent the complete biological system of the brain and do not allow for analysis of complex behavior in conjunction with measuring levels of neurotransmitter or brain activation. The current study can also not be performed in humans because of the following: 1. Studying the effects of different drug treatments on behavior and changes in neurotransmitters and brain activation in humans is not ethical, and 2. We cannot continuously sample neurotransmitters and or record from different brain regions through intracranial probes in a non-invasive way.

Reduction

The number of animals in this study is based on appendix 1 and 2. The intermediate results of these studies could reduce group size if possible. Study 1 will provide insights to the most optimal stimulation parameter to restore memory loss. Study 2 will provide insights which mechanism of action is responsible for restoring memory loss. In study 3 we will therefore only proceed with most optimal DBS target of study 1 and the intracranial sampling producing significant effects in study 2, which might reduce the number of animals. Moreover, only competent and trained persons will carry out the surgical procedure.

Refinement

We will choose the most suitable animal model for Alzheimer's for our study to reduce experimental duration time and we will further refine the model and stimulation paradigms for usage in future experiments. If more models are suitable to answer our research question, we will choose the one with the least degree of discomfort. By the experience gained in study 2, we can select the most suitable test to evaluate mechanisms of action of DBS (measure levels of neurotransmitters or measure brain

activation or both). Animal procedures that could not define a difference between groups will not be selected to use in this study. We will adapt the care to the need of the animals at the different stages of the experiment (e.g. recovery-food during recovery period after surgery, cage enrichment in case animals have to be single-housed, etc). Moreover, only competent and trained persons will carry out the surgical procedure.

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

Animals will be under general anesthesia during surgical procedures and will receive appropriate analgesics during the post-operative recovery period. Similarly, if animals show pain during any of the experimental procedures described, they will receive analgesics. To prevent the occurrence of more than predicted animal suffering, we will implement humane endpoints. The persons involved in this experiment possess a strong background of laboratory animal welfare experiences to minimize animal suffering, pain or fear.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

N/A

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

At the first instance we will house all animals in pairs to minimize distress. However, it is possible that rats may damage each other's electrode construct, which in turn could lead to injury, infection, and loss of the electrode construct. Consequently, this can cause a humane endpoint, euthanasia of the animal and a decrease of experimental power. This therefore introduces a consideration of animal welfare (Refinement) versus the Reduction principle of experimental animal ethics. In case only one rat pair damages each other's electrode construct, we will have to house all animals individually. However, to mitigate some of the negative consequences of individual housing, we will use enrichment objects (13).

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.

General anesthesia will be used for surgical procedures and imaging procedures. Animals will be monitored daily during the experimental procedures stated in section 2A and will be checked for signs of pain or discomfort. Analgesics will be applied to relief suffering e.g. during the pre-, peri- and post-surgical recovery period. Treatment of pain or suffering will be conducted according to the recommendations of GV-SOLAS: Pain management for laboratory animals (May 2015).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Animals with AD-like brain pathology could show potential DBS-related side effects different from the ones of naïve rats. These side-effects might lead to an adverse reaction and increase in discomfort or increased anxiety. Other possible adverse effects and measures to minimize severity of adverse effects on the animal's welfare are identical to the studies described in appendix 1 and 2.

Explain why these effects may emerge.

A transgenic model refers to animals in which the genome is altered through the use of genetic engineering techniques, while in an immunotoxin-mediated model we will inject an immunotoxin into the brain to initiate memory loss and mimic AD-like pathology. Depending on the AD model we will use, adverse effects might be related to brain pathology or the administered immunotoxins. Nevertheless, we will choose an AD model with the least degree of discomfort, which can answer our research question. It is known that rats with genetically- or chemically-induced AD-like pathology suffer from (progressive) cognitive impairment (8, 9). Contrary to this, basic neurological features such as righting response after being placed on the dorsal side, eye blink, ear twitch, and limb withdrawal in response to tactile stimuli, orienting response to a visual stimuli, startle response following an auditory stimulus, weight and feeding behavior seem to be comparable to age-matched wild-type rats (10, 11). It is difficult to predict the effects on an individual animal, so genetically engineered or immunotoxin-induced animals will be monitored closely to mitigate any unanticipated welfare concerns as they arise.

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

Animals will be visually inspected daily during experiments. Loss of an electrode construct during the postoperative period or behavioral testing is prevented by the extensive experience in behavioral testing and refinement of surgical techniques performed by our research group over the past 10 years. This has recently led to some detailed changes such as bending the DBS cables along the axis of the animal and using sufficiently high cages during behavioral testing. Additionally, completely drying the skull during stereotactic surgery and working aseptic will minimize electrode loss. Stress due to injections will be minimized by skilled injection techniques and handling of the animals. For animals that experience severe adverse effects caused by the nature of the AD model, humane endpoints will be applied.

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 will be based on considerations regarding general health, severe weight loss (20% body weight loss when compared to the pre-study weight), infections, loss of electrode construct and animal behavior considering the model. Besides cognitive decline, various AD or immunotoxin models do not show evidence for other neurological or physiological symptoms (14). If any unexpected clinical signs compromising animal welfare will be detected, we will implement humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

We estimate the incidence of implementing a humane endpoint at maximally 25%. In the course of this research proposal we will optimize surgical and animal procedures to reduce this 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').

- Behavioral tests: Mild to moderate discomfort. See table 1.
- Stereotactic surgery: moderate discomfort due to surgery.
- DBS and EEG measurements: mild discomfort due to new environment.
- Drug treatment: mild discomfort due to repeated injections
- Alzheimer animal model: moderate discomfort due to neurodegeneration.
- Possible individual housing: moderate discomfort due to non-social behavior
- PET-CT: mild discomfort, due to anesthesia and relocation of animals.
- Euthanasia: mild discomfort, due to anesthesia.

Cumulative discomfort: 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.

At the end of the experiments, all animals will be euthanized to isolate the brain and perform histologic analysis. Histologic analysis of the brain is needed to check for the correct electrode localization and to study the neuroanatomical effects of DBS and correlate this to behavioral outcome.

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

References

1. Book AA, Wiley RG, Schweitzer JB. 192 IgG-saporin: I. Specific lethality for cholinergic neurons in the basal forebrain of the rat. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53(1):95-102.
2. Tan S, Vlamings R, Lim L, Sesia T, Janssen ML, Steinbusch HW, et al. Experimental deep brain stimulation in animal models. *Neurosurgery.* 2010;67(4):1073-9.
3. Temel Y, Tan S, Vlamings R, Sesia T, Lim LW, Lardeux S, et al. Cognitive and limbic effects of deep brain stimulation in preclinical studies. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2009;14:1891-901.
4. Heschem S, Jahanshahi A, Meriaux C, Lim LW, Blokland A, Temel Y. Behavioral effects of deep brain stimulation of different areas of the Papez circuit on memory- and anxiety-related functions. *Behavioural brain research.* 2015;292:353-60.
5. Heschem S, Lim LW, Jahanshahi A, Steinbusch HW, Prickaerts J, Blokland A, et al. Deep brain stimulation of the forniceal area enhances memory functions in experimental dementia: the role of stimulation parameters. *Brain stimulation.* 2013;6(1):72-7.
6. Stone SSD, Teixeira CM, DeVito LM, Zaslavsky K, Josselyn SA, Lozano AM, et al. Stimulation of Entorhinal Cortex Promotes Adult Neurogenesis and Facilitates Spatial Memory. *The Journal of Neuroscience.* 2011;31(38):13469-84.
7. Jansen JF, Lemmens EM, Strijkers GJ, Prompers JJ, Schijns OE, Kooi ME, et al. Short- and long-term limbic abnormalities after experimental febrile seizures. *Neurobiology of disease.* 2008;32(2):293-301.
8. Burk JA, Herzog CD, Porter MC, Sarter M. Interactions between aging and cortical cholinergic deafferentation on attention☆. *Neurobiology of Aging.* 2002;23(3):467-77.

9. Leon WC, Canneva F, Partridge V, Allard S, Ferretti MT, DeWilde A, et al. A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(1):113-26.
10. Galeano P, Martino Adami PV, Do Carmo S, Blanco E, Rotondaro C, Capani F, et al. Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 2014;8(321).
11. Waite JJ, Thal LJ. Lesions of the cholinergic nuclei in the rat basal forebrain: excitotoxins vs. an immunotoxin. *Life Sci.* 1996;58(22):1947-53.
12. Barth C, Villringer A, Sacher J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Frontiers in neuroscience.* 2015;9:37.
13. Van Loo PL, Van de Weerd HA, Van Zutphen LF, Baumans V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Laboratory animals.* 2004;38(2):178-88.
14. Do Carmo S, Cuello AC. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Molecular Neurodegeneration.* 2013;8(1):37.



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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 3.4.4.4 | The role of neuropharmacology in DBS for dementia-related disorders |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The experimental design of this study is an evaluation of a combined intervention of drug treatments and deep brain stimulation (DBS) of the fornix or nucleus basalis in an animal model of disease. We will evaluate the effect on (behavioral) side effects and additional cognitive effect when DBS is combined with a drug treatment. We will use the same model as in appendix 3. Our findings in study 1 and 2, will guide us in choosing a suitable model of disease for the present study (e.g. animal model, in which brain pathology is accompanied by a decline of a certain neurotransmitter, change in brain activity etc.) This means that the outcomes of study 1 and 2 are essential to predict in which type of dementia DBS can help to alleviate symptoms. Possible choices are transgenic Alzheimer rats or immunotoxin-mediated rat models of dementia [1].

The primary aim of this study is to identify a drug that reduces DBS induced behavioral side effects and/or increases the cognitive effect of DBS. The readout parameters for behavioral side effects and the cognitive effect are dependent on the results of the study described in appendix 1. These will entail readout parameters generated by the specific behavioral tests and EEG recordings that have successfully shown the changes in cognition and behavior in these studies.

The secondary aim of this study is to evaluate the underlying mechanism of the combined intervention in reducing behavioral side effects and increasing cognitive effects. The readout parameters are dependent on the results of the study described in appendix 2. These will entail the readout parameters generated by the intracranial sampling and recordings methods and imaging methods that have

successfully shown changes in neurotransmitters and/or brain activation in study 2.

Table 1. Summary of the different behavioral tests and readout parameters.

Test paradigm	Item	Readout parameter	Discomfort
Barnes maze	memory	number of errors per trial, rate of decline in number of errors and path length	Mild discomfort, results in increased anxiety
Morris water maze	memory	time spent in the platform quadrant, escape latency and swimming speed	Moderate discomfort, animals will be in water
Cued and contextual fear conditioning	memory	percentage of time spent freezing and time to extinction	Moderate discomfort, small electrical shock will be administered
Object location task	memory	ratio of time spent at object in new versus old location	Mild discomfort, results in increased anxiety
Object recognition task	memory	ratio of time spent at new versus old object	Mild discomfort, results in increased anxiety
Y-maze	memory	Ratio left-right discrimination	Mild discomfort, results in increased anxiety
Skinner box paradigms e.g. reaction time and attention tasks	cognition	reaction time, incorrect responses, correct responses, premature responses	Moderate discomfort, animals will receive restricted feeding regimes or deprivation
Prepulse inhibition	cognition	startle response	Moderate discomfort, animals will temporarily be in a restrainer
Forced swim task	mood	immobility duration, latency to immobility, swimming duration, climbing duration	Moderate discomfort, animals will be in water
Sucrose intake/preference	mood	volume of sucrose intake corrected for animal weight	Mild discomfort, results in increased anxiety
Food intake	mood	volume of food intake corrected for animal weight	Moderate discomfort, animals will receive restricted feeding regimes or deprivation
Open field	anxiety and locomotion	total distance travelled, average speed and time spent in corners	Mild discomfort, results in increased anxiety
Elevated zero maze	anxiety and locomotion	total distance travelled, average speed and time spent in closed arms	Mild discomfort, results in increased anxiety
Home-cage emergency	impulsivity and anxiety	latency to escape	Mild discomfort, results in increased anxiety

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

This study entails a combined intervention of drug treatments and chronic DBS (maximal experimental duration of 10 months), EEG recordings, behavioral tests, and intracranial sampling and recording methods, MRI/PET-CT imaging and labelling of proliferative cells (e.g. bromodeoxyuridine) in animal models for neurodegenerative diseases (either transgenic or immunotoxin-mediated rat models of Alzheimer's). The definite animal procedures that will be performed in this study are dependent on the results of the studies described in appendix 1, 2 and 3.

Drug treatments

We estimate to use two different drug treatments to enhance DBS and/or reduce side effects. The choice for these drug treatments is dependent on the underlying mechanism of DBS and generation of side effects that is exposed by studies 1 and 2. However we predict it will be modulators of the glutamatergic and cholinergic neurotransmitter system such as memantine, an NMDA receptor antagonist and rivastigmine, an acetylcholinesterase inhibitor. Depending on the drug treatment to use, administration will either be intracranial, intraperitoneal, subcutaneous or oral. Different doses will be administered to see if there is a dose-response curve and to see which dose is most optimal for the combination therapy with DBS. We have also included a vehicle-control group (see Table 2).

Animal procedures

To evaluate the efficacy of DBS and drug treatments we will use the same behavioral tests and intracranial sampling, recordings, imaging and labelling methods that have displayed the underlying mechanism of DBS in studies 1, 2 and 3. Animal procedures in this study are thus similar to the procedures used in studies 1, 2 and 3. Stereotactic surgery will be performed as stated in appendix 2. Intracranial, intraperitoneal or subcutaneous injections of the different drug treatments, dependent on the nature of the drug are ultimately chosen. The outcomes of these tests will allow us to assess whether a drug is effective in enhancing the cognitive effect or reducing behavioral side effects of DBS, but also what the impact of this treatment is on the levels of neurotransmitters and activation of brain regions. The expected minimum number of behavioral tests is 4 and the maximum number of behavioral tests is 7. During treatment, by intravenous punctures and intracranial probes, blood (according to NC3R guidelines blood sampling decision tree) and CFS will be collected on a maximum weekly basis to monitor levels of inflammatory proteins or other markers specific for the possible side effects of the used drug treatments. After the proposed animal procedures, all rats are euthanized as appropriate and the brain is obtained for further histological processing. Since this study entails a chronic DBS experiment similar to appendix 1, 2 and 3, we estimate a maximal experimental duration time of 10 months per animal.

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

We have based the number of animals on literature review, previous studies performed by our research group and a power analyses. The power analyses is presented in section 2B.

B. The animals

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

Animals

These experiments require male adult rats with AD-like pathology or naïve animals (controls) purchased from a registered breeding facility. Our findings in study 1 and 2, will guide us in choosing a suitable model of disease for the present study (e.g. animal model, in which brain pathology is accompanied by a decline of a certain neurotransmitter, etc.) This means that the outcomes of study 1 and 2 are essential to predict in which type of dementia DBS can help to alleviate symptoms. For this, we will choose an AD model with the least degree of discomfort, which can answer our research question. Considering animal welfare, it is known that rats with genetically- or chemically-induced AD-like pathology suffer from (progressive) cognitive impairment [2, 3]. Contrary to this, basic neurological features such as righting response after being placed on the dorsal side, eye blink, ear twitch, and limb withdrawal in response to tactile stimuli, orienting response to a visual stimuli, startle response following an auditory stimulus, weight and feeding behavior seem to be comparable to age-matched wild-type rats [4, 5]. It is difficult to predict the effects on an individual animal, so genetically engineered or immunotoxin-induced animals will be monitored closely to mitigate any unanticipated welfare concerns as they arise.

Gender

We will only use male rats, since the oestrogen cycle can interfere with the behavioral outcome and brain biochemistry, such as release of the neurotransmitters dopamine and serotonin [6]. Accounting for sex as a biological variable in all biomedical research is considered fundamental for enhancing rigor and reproducibility in preclinical research. Since we have behavioral and neurochemical outcome measures, we therefore want to reduce the variability in our data by using only male rats.

Number of animals

The estimation on the total number of animals is based on the studies described in appendix 1 and 2 and our previous experience with DBS. This means that results of study 1 and 2 might lead to the exclusion of a DBS group together with its corresponding sham, if it was not able to restore memory loss based on behavioral and physiological parameters. Since we are investigating the potency of a drug treatment in combination with DBS to reduce side effects and increase the cognitive effect in an animal model of disease, we foresee a larger dropout rate than in study 1 and 2. We therefore estimate to need 22 per group for Alzheimer rats and 16 animals per group for naïve controls (no surgery). In total we will have a maximum of 9 groups, DBS and sham stimulation in Alzheimer rats and one control group (see table 2).

Power analysis: Literature review and previous experience indicate a significant effect at $\delta=0.3$ and a standard deviation of $\sigma=0.3$. The significance level is $P < 0.05$ and we require a power of $\eta=0.8$. The readout parameters for behavioral side effects and the cognitive effect are dependent on the results of the study described in appendix 1. These will entail readout parameters generated by the specific behavioral tests and EEG recordings that have successfully shown the changes in cognition and behavior in these studies. The readout parameters to evaluate the underlying mechanism of the combined intervention are dependent on the results of the study described in appendix 2. These will entail the readout parameters generated by the intracranial sampling and recordings methods and imaging methods that have successfully shown changes in neurotransmitters and/or brain activation in study 2.

$$N = 15.7 * (0.3/0.3)^2 = 15.7$$

Due to factors such as complication of surgery, correct electrode locations, possible electrode losses and additional dropout due to the disease model, we estimate 35% of loss per group.

$$N = 15.7 / 0.65 = 24.2 \text{ e.g. } 25 \text{ animals per group.}$$

Control animals are naïve rats and will not receive any electrodes, so we do not expect any complication factors.

Table 2: Number of animals needed for study 4. Please note that results of study 1 and 2 might lead to the exclusion of a DBS group together with its corresponding sham, if it was not able to restore memory loss based on behavioral and physiological parameters. Control rats are wild-type rats without AD pathology and DBS, but with the injection of vehicle. DBS, deep brain stimulation. NT, to study neurotransmitter changes; BA, to study changes in brain activity.

Study	Group	Number of animals
4 (AD-Chronic DBS + drugs)	NT AD rat fornix DBS	25
	NT AD rat nucleus basalis DBS	25
	NT AD rat fornix sham	25
	NT AD rat nucleus basalis sham	25
	BA AD rat fornix DBS	25
	BA AD rat nucleus basalis DBS	25

	BA AD rat fornix sham	25
	BA AD rat nucleus basalis sham	25
	control	16
4 (AD-Chronic DBS + vehicle)	NT AD rat fornix DBS	25
	NT AD rat nucleus basalis DBS	25
	NT AD rat fornix sham	25
	NT AD rat nucleus basalis sham	25
	BA AD rat fornix DBS	25
	BA AD rat nucleus basalis DBS	25
	BA AD rat fornix sham	25
	BA AD rat nucleus basalis sham	25

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 primary and secondary aims of this study, respectively, are to identify a drug treatment that reduces DBS induced behavioral side effects and/or increases the cognitive effect of DBS in an animal model of disease and to evaluate the underlying mechanism. These aims can only be achieved when using the same experimental procedures as used in appendix 1 and 2, since the methods used in this study are dependent on these studies. These aims cannot be achieved by use of in vitro experiments, computer modelling, lower animal species because these systems do not represent the complete biological system of the brain and do not allow for analysis of complex behavior in conjunction with measuring levels of neurotransmitter or brain activation. Also, we will choose a model chosen, which is the best representative for the Alzheimer patient population, that is receiving DBS therapy. The current study can also not be performed in humans because of the following: 1. Studying the effects of different drug treatments on behavior and changes in neurotransmitters and brain activation in humans is not ethical, and 2. We cannot continuously sample neurotransmitters and or record from different brain regions through intracranial probes in a non-invasive way.

Reduction

The number of animals in this study is based on appendix 1 and 2. The intermediate results of these studies could reduce group size if possible (i.e. proceed only with the most optimal DBS target of study 1 and intracranial sampling method producing significant effects in study 2). Moreover, only competent and trained researchers will carry out the surgical procedure.

Refinement

We will choose the best animal model for Alzheimer's to reduce experimental duration time and we will only use the most optimal stimulation paradigm derived from study 1. By the experience gained in study 2, we can better select the animal procedure to measure levels of neurotransmitters or measure brain activation. Animal procedures that could not define a difference between groups will not be selected to use in this study. Likewise to study 1 and 2, we will adapt the accommodation and care to the need of the animals. Moreover, only competent and trained researchers will carry out the surgical procedure.

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

Animals will be under general anesthesia during surgical procedures and will receive appropriate analgesics during the post-operative recovery period. Similarly, if animals show pain during any of the experimental procedures described, they will receive analgesics. To prevent the occurrence of more than predicted animal suffering, we will implement humane endpoints. The persons involved in this experiment possess a strong background of laboratory animal welfare experiences to minimize animal suffering, pain or fear.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

N/A

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

At the first instance we will house all animals in pairs to minimize distress. However, it is possible that rats may damage each other's electrode construct, which in turn could lead to injury, infection, and loss off the electrode construct. Consequently, this can cause a humane endpoint, euthanasia of the animal and a decrease of experimental power. This therefore introduces a consideration of animal welfare (Refinement) versus the Reduction principle of experimental animal ethics. In case only one rat pair damages each other's electrode construct, we will have to house all animals individually. However, to mitigate some of the negative consequences of individual housing, we will use enrichment objects [7].

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.

General anesthesia will be used for surgical procedures and imaging procedures. Animals will be monitored daily during the experimental procedures stated in section 2A and will be checked for signs of pain or discomfort. Analgesics will be applied to relief suffering e.g. during the pre-, peri- and post-surgical recovery period. Treatment of pain or suffering will be conducted according to the recommendations of GV-SOLAS: Pain management for laboratory animals (May 2015).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Animals could show a potential side effect which might lead to an adverse reaction and increase in discomfort or increased anxiety. Other possible adverse effects and measures to minimize severity of adverse effects on the animal's welfare are identical to the studies described in appendix 1 and 2.

Explain why these effects may emerge.

The drugs could cause side effects that result in animal discomfort. Because the selection of drugs is dependent on study 2, we cannot predict the side effects to expect. However, because we expect the drugs to be modulators of the glutamatergic and/or cholinergic neurotransmitter system, we can expect side effects such as increase in locomotor activity, food and water consumption. From the AD animal model it is known that rats with genetically- or chemically-induced AD-like pathology suffer from

(progressive) cognitive impairment [2, 3]. Contrary to this, basic neurological features such as righting response after being placed on the dorsal side, eye blink, ear twitch, and limb withdrawal in response to tactile stimuli, orienting response to a visual stimuli, startle response following an auditory stimulus, weight and feeding behavior seem to be comparable to age-matched wild-type rats [4, 5]. It is difficult to predict the effects on an individual animal, so genetically engineered or immunotoxin-induced animals will be monitored closely to mitigate any unanticipated welfare concerns as they arise.

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

Animals will be visually inspected daily during experiments. Loss of an electrode construct during the postoperative period or behavioral testing is prevented by the extensive experience in behavioral testing and refinement of surgical techniques performed by our research group over the past 10 years. This has recently led to some detailed changes such as bending the DBS cables along the axis of the animal and using sufficiently high cages during behavioral testing. Additionally, completely drying the skull during stereotactic surgery and working aseptic will minimize electrode loss. Stress due to injections will be minimized by skilled injection techniques and handling of the animals. For animals that experience severe adverse effects caused by the nature of the AD model or the drug treatment, humane endpoints will be implemented.

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 will be based on considerations regarding general health, severe weight loss (20% body weight loss when compared to the pre-study weight), infections, loss of electrode construct and animal behavior considering the model. Besides cognitive decline, various AD or immunotoxin models do not show evidence for other neurological or physiological symptoms [8]. If any unexpected clinical signs compromising animal welfare will be detected, we will implement humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

We estimate the likely incidence of implementing a humane endpoint at *maximally* 25%. In the course of this research proposal we will optimize surgical and animal procedures to reduce this 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').

-Behavioral tests: Mild to moderate discomfort. See table 1.
-Stereotactic surgery: moderate discomfort due to surgery.
-DBS and EEG measurements: mild discomfort due to new environment.
-Drug treatment: mild discomfort due to repeated injections, mild discomfort due to possible side effects
-Alzheimer animal model: moderate discomfort due to neurodegeneration.
-Possible individual housing: moderate discomfort due to non-social behavior
-PET-CT: mild discomfort, due to anesthesia and relocation of animals.
-Euthanasia: mild discomfort, due to anesthesia.

Cumulative discomfort: 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.

At the end of the experiments, all animals will be euthanized to isolate the brain and perform histologic analysis. Histologic analysis of the brain is needed to check for the correct electrode localization and to study the neuroanatomical effects of DBS and correlate this to behavioral outcome.

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

References

1. Book AA, Wiley RG, Schweitzer JB. 192 IgG-saporin: I. Specific lethality for cholinergic neurons in the basal forebrain of the rat. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53(1):95-102.
2. Burk JA, Herzog CD, Porter MC, Sarter M. Interactions between aging and cortical cholinergic deafferentation on attention☆. *Neurobiology of Aging.* 2002;23(3):467-77.
3. Leon WC, Canneva F, Partridge V, Allard S, Ferretti MT, DeWilde A, et al. A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(1):113-26.
4. Galeano P, Martino Adami PV, Do Carmo S, Blanco E, Rotondaro C, Capani F, et al. Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 2014;8(321).
5. Waite JJ, Thal LJ. Lesions of the cholinergic nuclei in the rat basal forebrain: excitotoxins vs. an immunotoxin. *Life Sci.* 1996;58(22):1947-53.
6. Barth C, Villringer A, Sacher J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Frontiers in neuroscience.* 2015;9:37.
7. Van Loo PL, Van de Weerd HA, Van Zutphen LF, Baumans V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Laboratory animals.* 2004;38(2):178-88.
8. Do Carmo S, Cuello AC. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Molecular Neurodegeneration.* 2013;8(1):37.

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 13 februari 2017 19:46
Aan: Info-zbo
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AW: Aanvullende informatie AVD107002016785

8

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Dear [REDACTED]
we thank the committee for their valid concern. After DBS surgery the animals will recover for 1-2 weeks before behavioral testing begins. Only at the end of behavioral testing we will perform MRI. In the unlikely event that the MRI scanner is not available at Maastricht University, we will transport the animals to a different facility. The time between DBS surgery and transport will thus be around 12 weeks or more. Animals will be under general anesthesia during surgical procedures and will receive appropriate analgesics during the post-operative recovery period. If animals show pain during any of the experimental procedures described, they will first receive analgesics. We will monitor the animals daily and implement humane endpoints on considerations regarding general health, severe weight loss (20% body weight loss), infections, loss of electrode construct and animal behavior throughout the study. We will thus transport only healthy animals.

With kind regards,
[REDACTED]

[REDACTED] | Maastricht
University | The Netherlands
[REDACTED]

Von: Info-zbo

Gesendet: Montag, 13. Februar 2017 16:38

An: [REDACTED]
[REDACTED]

Betreff: RE: Aanvullende informatie AVD107002016785

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw antwoord ontvangen. De CCD vindt het bezwaarlijk dat dieren na het ondergaan van een operatie naar een andere instelling vervoerd worden. Kunt u aangeven hoe lang de dieren de tijd krijgen om te herstellen van de operatie voordat ze vervoerd zullen worden en op welke wijze geborgd wordt dat de dieren voldoende hersteld zijn van de operatie om vervoerd te kunnen worden?

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 280028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: H [REDACTED]

Verzonden: vrijdag 3 februari 2017 13:11

Aan: info@zbo-ccd.nl

CC: [REDACTED]

Onderwerp: WG: Aanvullende informatie AVD107002016785

Dear Sir or Madam,

please find our response regarding your question on application AVD107002016785 below:

In the unlikely event that the MRI scanner is not available at Maastricht University, we mentioned in the proposal that we consider scanning the animals at a different location. For this we want to transport the animals between the locations and will file a working protocol and / or an ethical application at the local facility. Unfortunately, it is not possible to perform the entire experiment at an external location, because the DBS and EEG equipment is managed and shared in the lab environment of Maastricht University. Transportation of animals will take place with care and a dedicated animal transport service to cause the least amount of discomfort. Animals will also be able to recover for 5 days after transportation.

We hope this information meets your satisfaction.

With kind regards,

[REDACTED]

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

Sent: donderdag 26 januari 2017 14:39

To: [REDACTED]

Cc: [REDACTED]

Subject: Aanvullende informatie AVD107002016785

Geachte [REDACTED]

Op 15 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Deep brain stimulation to restore memory loss' met aanvraagnummer AVD107002016785. Wij hebben nog een vraag over uw aanvraag.

U geeft aan te overwegen, bij het niet beschikbaar zijn van de MRI scanner in de eigen instelling, uit te wijken naar een andere locatie. Uit uw aanvraag blijkt echter niet of in dergelijke situaties dieren die al in een proef zijn opgenomen tussen beide locaties vervoerd zullen worden of dat in die situaties de gehele proef op de andere locatie uitgevoerd zal worden. U wordt verzocht dit te verhelderen.

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

DEC-advies PV 2016-014/ [REDACTED]

Preambule:

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Deep brain stimulation to restore memory loss?*
3. **Titel van de NTS:** *Diepe hersenstimulatie bij geheugenverlies.*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe** aanvraag projectvergunning
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC; *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon; [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon; [REDACTED]
6. **Adviestraject:** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC-UM 03-11-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken 11-11-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. **Afstemming IvD:**
 - De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD *dd. 03-11-2016*.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum 16-11-2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Algemene opmerkingen:

1. **Opmerking:** Het verdient aanbeveling de noodzaak tot het gebruik van mannelijke dieren (nog) beter te onderbouwen.

Reactie:

We will only use male rats, since the estrogen cycle can both interfere with behavior, but also neurochemistry. Accounting for sex as a biological variable in all biomedical research is considered fundamental for enhancing rigor and reproducibility in preclinical research.

Since we have behavioral and neurochemical outcome measures, we therefore want to reduce the variability in our data by using only male rats. We have now added this information to the different appendices.

2. **Opmerking:** Gelieve de uitleesparameters van de poweranalyses te vermelden op de daartoe strekkende plaats in de bijlagen.

Reactie:

We thank the reviewers for this suggestion and have added the outcome measures of the power analyses to the different appendices.

3. **Opmerking:** Gelieve onder de humane eindpunten aan te geven over welke periode een gewichtsverlies van 25% relevant wordt.

Reactie:

We will employ a humane endpoint if the animal loses 25% of body weight when compared to his pre-study weight. We have now added this information to the different appendices.

Vraag:

1. Er wordt gesproken over een combinatie van DBS en medicatie. Valt het hierbij niet aan te bevelen DBS (en eventuele combinatie met nieuwe medicamenten) ook te vergelijken met de standaard medicatie voor AD?

Antwoord:

Standard medication for AD are acetylcholinesterase inhibitors (donepezil, galantamine, rivastigmine) and NMDA receptor antagonists (memantine). These medications therefore have an impact on the cholinergic and glutamatergic system. In fact, for the current project proposal we would like to make use of the standard treatment modalities and try to combine them with DBS to enhance the therapeutic effects. We have stated this now more clearly in the project proposal.

3.3. Belang

Vraag:

1. Kunt U iets specifieker zijn over de bevindingen van de phase-I klinische trial? Is Uw studieopzet (b.v. instellingen DBS) hierop aangepast?

Antwoord:

Laxton et al. performed the first DBS study in which six patients with mild AD were implanted with electrodes in the vicinity of the fornix. After an intraoperative evaluation of stimulation to survey for recollective experiences and adverse effects, patients received chronic high frequency DBS for a period of 12 months (3.0–3.5 V, 130 Hz and 90 µs pulse width). The authors have found that the application of DBS in the hypothalamus/fornix vicinity was safe and triggered neural activity in the memory circuit, including the entorhinal and hippocampal areas. PET scans showed an early and striking reversal of the impaired glucose utilization in the temporal and parietal lobes that was maintained after 12 months of continuous stimulation. Evaluation of the Alzheimer's Disease Assessment Scale cognitive subscale and the Mini Mental State Examination suggested possible improvements and slowing the progression of memory loss at 6 and 12 months, especially in patients that were less severely affected at the time of surgery. In fact, 2 out of 6 patients showed cognitive improvements, 1 patient remained stable and the other 3 deteriorated. Indeed, our presented project proposal is partly build upon this study. Because the clinical results were inconclusive, we feel that it is important to investigate the effects of DBS on the fornix with a variety of stimulation parameters and also to examine neurochemical and neurophysiological responses.

With the studies proposed here, we would like to provide robust scientific evidence for the application of DBS in memory-related disorders.

We also would like to test, whether fornix DBS or nucleus basalis of Meynert DBS (another DBS target, which has been investigated in the clinical setting) is more favorable.

There is a foreseeable possibility that findings of this proposal will facilitate the investigation and management of DBS in patients with memory impairment. We have now described the findings of the phase I trial in more detail and mentioned how our proposed experiments will contribute to the application of DBS in memory-related disorders.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1

1. **Vraag:** Het gros van alle gedragstesten leent zich niet voor herhaaldelijk gebruik. Hoe vangt U dit op gezien Uw plan tijdens zowel on als off stimulatie te testen binnen hetzelfde dier?

Antwoord:

The reviewers are correct, we need to re-phrase our sentence in the project proposal. In fact, we have sham groups included in all the appendices. Only DBS groups receive "on-stimulation". Sham groups have electrodes attached to their constructs, but the stimulator is switched off ("off-stimulation"). We have now stated this more clearly under 3.4.1 of the project proposal.

2. **Vraag:** Kan men subacute en chronisch effecten uitsluiten wanneer men off-stimulatie na on-stimulatie test?

Antwoord:

Please see the response to question 1 above (3.4.1-1).

3.4.2

1. **Vraag:** Wat betreft celproliferatie, kan men subacute en chronisch effecten uitsluiten wanneer men off-stimulatie na on-stimulatie test?

Antwoord:

Please see the response to question 1 above (3.4.1-1).

2. **Vraag:** De go-no go opzet is in deze studie wellicht te voorzichtig, daar de aard van het geheugenverlies bij Study 1 (en effecten van DBS daarbij) niet gelijk hoeven te zijn aan de aard van het geheugenverlies bij AD ratmodellen. Het gebrek aan een effect bij Study 1 lijkt zo niet direct van invloed op de kans op een effect bij de volgende studies. Valt het niet aan te bevelen de optimalisatie zoals bij Study 1 voorgesteld direct binnen een AD rattenmodel te doen?

Antwoord:

The reviewers raise a valid concern. In the proposed project, however, both study 1 and study 2 are needed in order to guide us in choosing a suitable model of disease for the present study (e.g. animal model, in which brain pathology is accompanied by a decline of a certain neurotransmitter, change in brain activity etc.). This means that the outcomes of study 1 and 2 are essential to predict in which type of dementia DBS can help to alleviate symptoms. Until now, DBS for dementia-related disorders has been inconclusive in the clinical setting. This is mainly, because little is known about mechanisms of action or optimal protocols. One of the main conclusions of a recent phase II trial was that the stimulation parameters applied to AD patients are not disease-specific (Lozano et. al, J Alz Dis, 2016). Evidently, a major drawback of the current neuromodulation approaches is that the clinical application of DBS is moving faster than the scientific evidence supporting or discouraging its application. With study 1 and study 2, we will therefore optimize stimulation protocols for different target areas and define potential mechanisms of action and apply this information to study 3 and 4. Moreover, our suggested scopolamine-induced rat model of dementia is easier to handle and induces acute memory loss, which is more relevant to answer our research question (appendix 1).

If we would investigate optimal stimulation parameters in a randomly chosen animal model of dementia (e.g. transgenic AD rat), we will not be able to answer our research question in a straightforward fashion.

In most AD models, memory loss is usually progressive/does not have an acute onset and therefore comparing different stimulation parameters will be more laborious.

3. **Vraag:** Kan men subacute en chronisch effecten uitsluiten wanneer men achtereenvolgens verschillende stimulatieparameters varieert (low-high frequency; meerdere amplitudes; meerdere pulse-widths)?

Antwoord:

We will always apply a minimum of 24h stimulation-off period between different stimulation parameters and have added this information to the project proposal. We have performed a similar paradigm before (Hescham et al., Brain Stim, 2013) and believe that a short DBS stimulation period during behavioral testing (i.e. under 5 min) is insufficient to induce pronounced long-term changes.

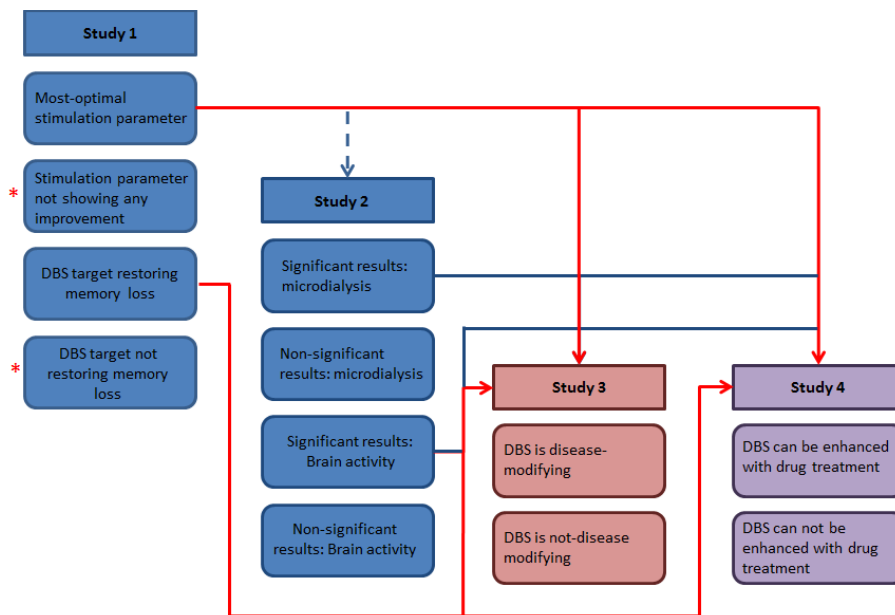
3.4.3

Algemene opmerking:

1. Figuur: wellicht optimale stimulatieparameter en hersengebied samennemen en de meest veelbelovende combinatie testen in Study 3&4?

Reactie:

We thank the reviewers for their suggestion. In fact, we intended to do so (test the most optimal stimulation parameter and DBS target in study 3&4). Below, we have highlighted the corresponding go-conditions in red.



Algemene vragen/opmerkingen appendices:

- Bij alle vier appendices is de geschatte uitval in B gelijk aan het percentage dieren waarbij naar schatting van de onderzoekers een humaan eindpunt van toepassing is, in J. Er zijn toch meer redenen voor uitval dan het bereiken van humane eindpunten? Zo ja, dan dient het percentage drop-outs hoger te zijn dan dat bij humane eindpunten.

Antwoord:

*The reviewers are correct. We estimated the incidence of implementing a humane endpoint at **maximally** 25%. With this number, we wanted to include all possible scenarios of the predicted drop-out rate mentioned under B.*

However, there needs to be a clear distinction, between implementing a humane endpoint and expected drop-out rates.

Implementing a humane endpoint results in euthanasia of animals which are close to suffering and the judgement of euthanasia is based on predefined clinical signs.

Loss of extra animals can be due to unforeseen matters like electrode loss, intraoperative death, etc. Also, we can only verify correct electrode placement post-mortem, which poses another potential drop-out factor. Because of the abovementioned reasons, we should decrease our estimation of implementing a humane endpoint and have therefore adapted the numbers in the revised appendices.

- Dat 35% van de dieren ten gevolge van een humaan eindpunt uitvalt, vindt de DEC-UM erg hoog. (appendix 3 en 4, laatste zin onderdeel J). Is het niet aan te bevelen de experimentele handelingen vooraf beter te optimaliseren?

Antwoord:

*Our response to the previous question is also relevant here. Because of the AD rat model (either transgenic or neurotoxin-induced) we estimated the incidence of implementing a humane endpoint higher than for the first two appendices (**maximally** 35%). With this number, we wanted to include all possible scenarios of the predicted drop-out rate mentioned under B. However, there needs to be a clear distinction, between implementing a humane endpoint and expected drop-out rates. Implementing a humane endpoint results in euthanasia of animals which are close to suffering and the judgement of euthanasia is based on predefined clinical signs. Loss of extra animals can be due to unforeseen matters like electrode loss, intraoperative death, etc. Also, we can only verify correct electrode placement post-mortem, which poses another potential drop-out factor. Because of the abovementioned reasons, we should decrease our estimation of implementing a humane endpoint and have therefore adapted the numbers in the revised appendices.*

3.4.4

Appendix 1

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. **Vraag:** Gros van deze gedragstaken is niet geschikt voor herhaaldelijk (large-scale screening) gebruik, terwijl dat juist wel de opzet van b.v. Study 1 omvat. Hoe ondervangt U dit?

Antwoord:

It is true that the majority of the behavioral tests cannot be performed unremittingly, but we also did not plan to do so. We rather wanted to establish the most optimal stimulation parameter with a test, that can be done repeatedly (such as Object Location Task, Object Recognition Task, Y-Maze, Prepulse Inhibition or a modified version of the Morris Water Maze) and then test this stimulation parameter in other tasks. We have added this information to the corresponding appendix accordingly. As for large-scale screening with an AD rat model, we will evaluate behavioral parameters at certain time intervals. For example, when looking at anxiety measures, we will always keep two identical behavioral tasks a minimum of 4 weeks apart. This time interval has been employed by our group in previous studies and has been generally accepted by peer-reviewers.

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

2. **Vraag:** Men zegt dat plaatsen van sham implantaties onethisch is bij mensen. Uiteraard correct, doch men heeft toch ook data van off-stimulatie, hetgeen hetzelfde doel kan dienen, nietwaar?

Antwoord:

We thank the reviewers for their valid concern. In principle this is true, however off-stimulation data in humans is always compromised by a few factors. As mentioned in the project proposal, the use of sham surgery in human research is controversial as it places ethical and research standards into conflict. While sham surgery has the potential to harm the subject, research designs without sham surgery are scientifically less rigorous. Therefore, researchers sometimes include short periods of "off-stimulation" into their stimulation paradigms.

However, all subjects with implanted DBS electrodes will be stimulated eventually, thereby making appropriate comparisons to controls, especially in long-term studies, almost impossible in human research. Therefore, sham-controlled studies are very rarely performed in humans and this is why the field can highly benefit from preclinical experiments.

B. De Dieren.

1. **Vraag:** Waar is de vehicle-controle vergelijking voor iedere behandelde (drug) groep terug te vinden? Er lijkt nu slechts 1 vehicle-groep (absolute WT controle) te worden gehanteerd, nietwaar?

Antwoord:

The reviewers are correct. We have included a vehicle-control group for the different DBS groups.

- Datum antwoord 29-11-2016
- Verstreckte antwoorden: Zie hierboven
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. **Eventuele adviezen door experts:** (niet lid van de DEC-UM) **N.V.T.**

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.V.T.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan.

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen.

Zie antwoord op vraag C5.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel en toegepast wetenschappelijke project, dat gericht is op inzicht in deep brain stimulation (DBS) als mogelijke behandeling van geheugenverlies, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep/patiënten en hun naasten, en ook de medische wetenschap en de samenleving als geheel.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen, de individuele huisvesting, het leven met elektroden in de hersenen en de opoffering aan het eind van de proeven. Het merendeel van de proefdieren zal matig ongerief ondervinden, voor de overige dieren wordt het ongerief geclassificeerd als non-recovery.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers vergaren kennis over de achterliggende mechanismen en de effecten van DBS op het geheugen.

De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen die relevant is in het onderzoek naar de ziekte van Alzheimer (AD) en deze kennis delen met de wetenschappelijke gemeenschap.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Uiteindelijk kan meer kennis over de mogelijke toepassing van DBS bij AD leiden tot verbeterde therapeutische mogelijkheden. Daardoor zou de kwaliteit van leven van deze patiënten en hun naasten verbeterd kunnen worden.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. AD komt in onze samenleving steeds vaker voor en er is behoefte aan werkzame en veilige therapieën op dit gebied. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe.

De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe. **N.V.T.**
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren.

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen, de individuele huisvesting en het leven met elektroden in de hersenen. De dieren worden aan het eind van de proef opgeofferd.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe.

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord.

- 15.

De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

16. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord.

Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse.

17. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

18. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Onderbouw uw antwoord.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC-UM reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

19. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

*In onderhavige projectaanvraag worden dieren van een **eenvormig** geslacht gebruikt. Alhoewel de DEC-UM vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC-UM niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.*

20. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

21. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Adoptie is ten aanzien van onderhavige aanvraag niet opportuun daar het hier niet handelt om niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren.

NTS

22. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in het effect van DBS op geheugenverlies, de opoffering en het matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Deep brain stimulation to restore memory loss?"

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *matig nadeel.*

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *matig voordeel.*

Algemeen: *relevante groei van medische kennis.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Deep brain stimulation to restore memory loss" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na voornamelijk matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren wordt geschaad door de experimentele handelingen, de individuele huisvesting, het leven met elektroden in de hersenen en de opoffering aan het eind van de proeven. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot kennis over het effect van DBS op geheugenverlies en eventuele bijwerkingen, waarbij verschillende stimulatieparameters worden gevarieerd, zoals frequentie en duur van stimulatie. Tevens zal er kennis zijn verkregen over de onderliggende mechanismen van DBS en de betreffende bijwerkingen. Ten slotte zal er kennis zijn verkregen over de effecten van verschillende neurofarmaca in combinatie met DBS in de behandeling van geheugenverlies in een Alzheimer diermodel.

De verwachting is dat de verworven inzichten op termijn bouwstenen kunnen leveren voor een betere behandeling van Alzheimer patiënten. AD is een veel voorkomende aandoening, die voor de patiënt een hoge ziektelast en zorgbehoefte met zich meebrengt en ook voor de naasten zeer belastend is. Het huidige therapeutische arsenaal is beperkt. Door een verbeterde therapie van AD zou uiteindelijk de kwaliteit van leven verbeterd kunnen worden van grote aantallen patiënten en hun naasten.

Daarnaast is passende zorg voor deze categorie patiënten tijdrovend en kostbaar. Dit onderzoek heeft daarom ook belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616
6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002016785
Bijlagen
1

16 FEB. 2017

Datum 15 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Deep brain stimulation to restore memory loss" met aanvraagnummer AVD107002016785. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 3 februari 2017 en 13 februari 2017 heeft u uw aanvraag gewijzigd. Wij hebben u om aanvullende informatie gevraagd over het vervoer van dieren tijdens de proef. U geeft aan dat er tussen de operatie en eventueel vervoer circa 12 weken zit, dat alleen dieren die gezond genoeg zijn vervoerd zullen worden en dat dieren na transport 5 dagen de tijd krijgen om te acclimatiseren. Wij kunnen ons hierin vinden.

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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Deep brain stimulation to restore memory loss" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 februari 2017 tot en met 1 februari 2022.

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.

Datum:
15 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD1.07002016785

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 15 december 2016. 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 8 februari 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC heeft ons aanvullend geadviseerd over eventuele strijdigheid met andere wetgeving, mogelijke milieueffecten, de relatie tussen het directe doel en het indirecte doel, de relatie tussen het directe doel en de status van het onderzoeksveld en de onderbouwing van het toepassen van huisvesting anders dan volgens bijlage III van de richtlijn.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-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).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
15 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002016785



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht
Adres: Postbus 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 februari 2017 tot en met 1 februari 2022, voor het project "Deep brain stimulation to restore memory loss" met aanvraagnummer AVD107002016785, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project is Post-Doctoral researcher verantwoordelijk. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 december 2016, ontvangen op 15 december 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 3 februari 2017 en 13 februari 2017

Aanvraagnummer:
AVD107002016785

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. The effects of fornix and nucleus basalis DBS on cognition, behavior and neuronal networks				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	84	100% Matig	
3.4.4.2. Changes in neurotransmitters and brain activation induced by acute and chronic fornix and nucleus basalis DBS				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	280	25% Terminal 75% Matig	
3.4.4.3. Long-term DBS in an animal model of disease				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	216	100% Matig	
3.4.4.4. The role of neuropharmacology in DBS for dementia-related disorders				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	416	100% Matig	

Voorwaarden

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

Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2023 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 de dierproeven conform de vergunning waren.

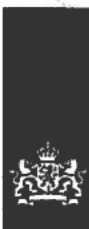
Aanvraagnummer:
AVD107002016785

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

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Voorschriften

Dieren mogen gedurende een proef niet verplaatst worden. Indien, vanwege het niet beschikbaar zijn van een MRI scanner in de eigen instelling, dieren naar een andere locatie vervoerd moeten worden, moet de hele proef op de andere locatie uitgevoerd worden.



Aanvraagnummer:
AVD107002016785

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:
AVD107002016785

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.

Locatie

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616
6200 MD Maastricht

**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
AVD107002016785

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 15 maart 2017

Betreft Correctie beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 december 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Deep brain stimulation to restore memory loss" met aanvraagnummer AVD107002016785.

Beslissing

Op 15 februari 2017 heeft u de beschikking en vergunning van uw aanvraag ontvangen. In de beschikking staat vermeld dat wij ons kunnen vinden in uw toelichting over het vervoer van dieren tijdens de proef. Uit uw toelichting blijkt namelijk dat er tussen de operatie en eventueel vervoer 12 weken zit, dat alleen dieren die gezond genoeg zijn vervoerd zullen worden en dat dieren na transport 5 dagen de tijd krijgen om te acclimatiseren. In de vergunning is echter het volgende voorschrift opgenomen: "Dieren mogen gedurende een proef niet verplaatst worden. Indien, vanwege het niet beschikbaar zijn van een MRI scanner in de eigen instelling, dieren naar een andere locatie vervoerd moeten worden, moet de hele proef op de andere locatie uitgevoerd worden." Dit voorschrift is ten onrechte in uw vergunning opgenomen.

De aan u verstuurd vergunning bevat dus een kennelijke verschrijving en moet gecorrigeerd worden. Bovengenoemd voorschrift komt hierbij te vervallen. Voor het overige blijft het besluit van 15 februari 2017 ongewijzigd.

Deze brief dient u bij uw vergunning te voegen.

Bezwaar

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

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

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


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

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

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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