

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20171674	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	Projectvoorstel				x		x			
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x						
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x						
6	DEC-advies				x		x			
7	Ontvangstbevestiging				x		x			
8	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
9	NTS aangepast	x								
10	Adviesnota CCD		x						x	
11	Beschikking en vergunning				x		x			

10300 2017 1674

1.



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 0 8 . 2 0 1 7 |
| Einddatum | 0 1 . 0 8 . 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Resolving the cell-specific actions of SDF-1 in kidney injury and regeneration
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar nieuwe aanknopingspunten voor de ontwikkeling van behandelingen etc
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------|
| Naam DEC | RU DEC |
| Postadres | [Redacted] |
| E-mailadres | [Redacted] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[REDACTED]
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	08 - 05 - 2017
Handtekening	[REDACTED]



Format**Niet-technische samenvatting**

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven.
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Onderzoek naar nieuwe aanknopingspunten voor de ontwikkeling van behandelingen die nierschade kunnen beperken of genezen
1.2	Looptijd van het project	1-8-2017 - 1-8-2022
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	parietale epitheelcel, nierziekte, proximale tubulus, regeneratie, stromal derived factor 1

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 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Voor veel patiënten met acute of chronische nierziekten is geen adequate behandeling mogelijk, mede omdat voor verschillende nierziekten de onderliggende mechanismen onbekend zijn. Zowel in acute- als chronische nierschade zijn de nierbuisjes en de kleine bloedvaatjes (glomeruli en microvasculatuur) in de nier beschadigd. Wanneer deze nierschade niet tijdig wordt hersteld/gerepareerd treedt er verlies op van de nierfunctie. SDF-1 is een eiwit dat van belang lijkt te zijn voor een goede conditie en mogelijk herstel van de nierbuisjes en kleine bloedvaatjes. Om dit in detail te onderzoeken zullen we gebruik maken van speciale muizen waarin we SDF-1 of zijn receptoren gericht (cel-specifiek) kunnen uitschakelen. Door in deze muizen nierschade te induceren wordt precies duidelijk waar in de nier en wanneer tijdens het ziekteproces SDF-1 en zijn receptoren hun rol spelen en waar en wanneer er aanknopingspunten zijn voor nieuwe behandelingen.
3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Het beschreven onderzoek zal resulteren in nieuwe inzichten in de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij schade en herstel van de nierbuisjes en de kleine bloedvaatjes van de nier. De resultaten van dit onderzoek zullen we gebruiken om een follow-up studie in diersystemen te ontwikkelen. In deze diersystemen voor nierschade willen wij verder bestuderen of behandelingen gericht op SDF-1 de nierschade kunnen voorkomen of herstellen. Uiteindelijk doel is de ontwikkeling van een behandeling die de nierschade remt en herstel van het nierweefsel bevordert.
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	De experimenten zullen worden uitgevoerd in muizen. We verwachten gedurende vijf jaar in totaal maximaal 1086 muizen nodig te hebben.
3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De mogelijke negatieve gevolgen voor de dieren bestaan uit: <ul style="list-style-type: none">- Stress en ongemak door huisvesting in een metabole kooi- Stress, ongemak en pijn veroorzaakt door een injectie- Ongemak, en conditieverlies veroorzaakt door de nierschade- Ongemak en bijwerkingen veroorzaakt door gen-deficiëntie- Ongemak veroorzaakt door operatie (ischemie reperfusie model)- Ongemak door plaatselijke afbraak van spierweefsel

3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Het merendeel van de dieren in het onderzoek zal licht ongerief ondervinden (~58%). Het overige deel van de dieren zal matig ongerief ondervinden (~42%). Geen van de muizen zal ernstig ongerief ondervinden.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De proefdieren worden aan het einde van het experiment gedood om verder ongerief te voorkomen en om nieren en bloed te kunnen verwijderen voor verdere analyse.

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	De rol van SDF-1 in de cel onderzoeken we voor een groot deel in celweek systemen. Echter om de rol van SDF-1 in de (patho)fysiologie van de nier te onderzoeken hebben we een complex organisme nodig met een bloedsomloop en waarin alle verschillende niercellen aanwezig zijn. We kunnen daarom geen gebruik maken van proefdiervrije alternatieven.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Informatie uit voorgaande studies wordt gebruikt om de dierexperimenten zo te ontwerpen dat er zo min mogelijk dieren worden gebruikt om wetenschappelijk betrouwbare resultaten te krijgen. In de proefopzet zijn 'go/no go' momenten ingebouwd om, op basis van al verkregen resultaten, te beoordelen of de resterende proeven uitgevoerd kunnen/moeten worden. Op die manier wordt het aantal benodigde dieren beperkt tot het minimale aantal.
4.3	Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	Alleen in muizen kunnen we het te onderzoeken gen in nierweefsel uitschakelen en de complexe pathologie van de nierziekten van de mens nabootsen. In onze studies maken we gebruik van cel-specifieke induceerbare knock-out muizen. Dit betekent dat we het te onderzoeken gen in specifieke cellen en op elk gewenst moment kunnen uitschakelen. De muis is hierdoor alleen deficiënt voor het gen gedurende het dierexperiment, en niet voorafgaand aan het experiment zoals in een conventionele knock-out muis. Mogelijk ongerief als gevolg van de deficiëntie is naar verwachting ook minder omdat het gen alleen in de te onderzoeken cellen wordt uitgeschakeld en niet in alle cellen van de muis.

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

Alle dieren zullen dagelijks gecontroleerd worden op welzijn, waarbij gelet wordt op

- ademhaling,
- toestand van de vacht
- (ernstige) gewichtsafname
- hun gedrag.

Zodra afwijkende zaken worden geconstateerd die het doel van de proef onmogelijk maken of onnodig ongerief veroorzaken, zullen de dieren uit de proef genomen worden.

Sommige muizen zullen gedurende de proeven in een metabole kooi gehuisvest worden om urine (voor analyse) te kunnen opvangen. Om ongerief als gevolg van verblijf in de metabole kooi te beperken zullen er schuilhuisjes in de metabole kooi geplaatst worden.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Resolving the cell-specific actions of Stromal Derived Factor 1 in kidney injury and regeneration |

2 Categories

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

 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.
-

Kidney diseases are a dominant problem and also a common complication in critically ill patients. The morbidity and mortality as well as the financial burden to the society still remain unacceptable high [1-3]. The kidney can be affected seriously for several reasons such as sepsis, toxic injury or ischemic insults leading to a rapid failure of the kidney to filter blood, regulate the ion and water balance and generate urine which can have systemically consequences [4]. During kidney diseases, the kidney function declines in response to injury because of a rapid fall in glomerular filtration rate, with a high risk of progression into chronic kidney disease (CKD) and a complete loss of kidney function. After kidney injury, the damaged cells of the different nephron segments have to be repaired by regeneration to restore the kidney function. Given the complex renal structure and multiple cell types present in the kidney, it is likely that different mechanisms of cell renewal and regeneration exist in the kidney. Because of the high incidence and a limitation of available therapies to enhance repair and regeneration after injury, it is of high importance to find pathways which can be pharmacologically triggered to stimulate regeneration or inhibit pathways contributing to a poorer pathologic outcome in kidney disease.

Chronic kidney disease

Chronic kidney disease (CKD) is a general term for heterogeneous disorders affecting kidney structure and function. Chronic kidney disease contributes to cardiovascular morbidity and mortality, and often progresses to end stage renal disease. CKD is generally associated with increasing age, diabetes, hypertension, obesity, urological and cardiovascular disease and specific kidney diseases. The increased prevalence of CKD, the high morbidity and mortality rates, the high costs and poor outcomes of treatment constitute a worldwide public health threat.

Regardless of the initial insult(s), CKD is characterized by stereotypical kidney injury responses seen pathologically as glomerulosclerosis, i.e. scarring of the glomerulus (the filtration unit of the kidney), tubular atrophy, peritubular capillary rarefaction as well as interstitial fibrosis and inflammation (5). The fibrosis/sclerosis and capillary rarefaction occur commonly in parallel. On the one hand, microvascular loss may occur as a result of tubular atrophy and fibrosis, whereas on the other hand microvascular loss may itself contribute to kidney fibrosis due to hypoxic injury (6-10). Preservation of the glomerular and peritubular capillary architecture is therefore a central target of both existing and novel renoprotective therapies (9). Recently, the stromal derived factor 1 (SDF-1)/CXCR4/CXCR7-axis has emerged as a major player in renal vascular development, maintenance and neo-angiogenesis (10-12).

The SDF-1/CXCR4/CXCR7-axis

We will study the SDF-1/CXCR4/CXCR7-axis as an important signalling pathway and possible therapeutic target to treat CKD. In adults, the role of SDF-1 was originally defined in maintenance of the hematopoietic stem cell niche and B-cell lymphopoiesis. However, the near ubiquitous tissue distribution of SDF-1 and its rapid degradation in blood suggests much broader intra-organ specific functions. SDF-1 is a small cytokine belonging to the chemokine family that is also designated chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12). SDF-1 signals via its main receptor CXCR4. The fundamental nature of the SDF-1/CXCR4 relationship is revealed by the development of identical defects in vasculogenesis and organogenesis leading to lethality in the absence of either gene (13). Recently, CXCR7 has been identified as a second receptor for SDF-1, which acts as a scavenger for SDF-1 (14-16). More recently, SDF-1 was identified as an angiogenic factor, important for the recruitment of endothelial progenitor cells and proliferation of endothelial cells (17-19). Within the kidneys, it has been shown that SDF-1 signalling via its receptor CXCR4 is essential for the development of the kidney vasculature (11;12). Because similar developmental processes may be recapitulated in the disease setting, SDF-1 may have also an important role in the maintenance and regeneration of the capillaries in chronic kidney disease (CKD) (10).

However, the role of SDF-1 signalling in the adult kidney appears to be context-dependent. For instance, several studies in acute kidney injury (AKI) and CKD support a renoprotective function for SDF-1 signalling (10;20;21), whereas other studies have proposed that SDF-1/CXCR4 signalling is associated with progression of kidney fibrosis and inflammation (22-24). In this case, inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis resulted in attenuation of the disease (22;24-26). For instance, CXCR4 mediated hyperproliferation of glomerular parietal cells (PECs) may contribute to the development of glomerulosclerosis (22). In addition, persistent expression of SDF-1 by myofibroblast facilitates chronic inflammation by recruitment and retention of leukocytes (27). Therefore, the effects of SDF-1 signalling are likely contextual and varying according to stage of the disease and underlying injurious insult.

SDF-1 signalling in glomerulosclerosis

Progressive glomerular injury results in glomerulosclerosis, the leading cause for end-stage renal disease. Glomerulosclerosis is characterized by progressive scarring of the glomerulus. In experimental models and human biopsies studies we have shown that activated parietal epithelial cells (PECs) play a crucial role in development of glomerulosclerosis (28-33). A normal glomerulus consists of the endocapillary compartment and epithelial cells: podocytes lining the capillary tuft and PECs lining the inside of Bowman's capsule. Formation of a sclerotic lesion is triggered by a primary insult to podocytes followed by activation of PECs. Migration and proliferation of the activated PECs on the glomerular tuft lead to progression of glomerulosclerosis as more of the former capillary loops are covered by PECs and matrix. Currently, there are limited options for treatment of glomerulosclerosis available. Our findings suggest that persistent activation of PECs is driving disease progression and that pharmacological inactivation of PECs represents an effective and targeted treatment option to slow-down loss of renal function (28;30).

The molecular signalling pathways directing the activation, proliferation and migration of PECs are unknown. The SDF-1/CXCR4 and CXCR7 -axis is a promising candidate for several reasons: In the healthy glomerulus the chemokine SDF-1 is constitutively expressed and interacts presumably in a paracrine fashion with CXCR4 that is almost exclusively expressed by the endothelial cells (11).

In glomerulosclerosis, PECs start to express SDF-1 and show an increased expression of CXCR4 (34). In addition, increased expression of CXCR4 by PECs was shown to be functionally associated with proliferation (22). Furthermore, we showed SDF-1 stimulated chemotaxis of PECs (unpublished observations).

We hypothesize that upregulation of the SDF-1/CXCR4/CXCR7-axis in parietal epithelial cells (PECs) is essential for the activation of PECs and therefore for development of glomerulosclerosis. Thus, Inhibition of SDF-1 or the receptors may attenuate development of glomerulosclerosis.

SDF-1 signalling in tubular injury

The role of SDF-1 and CXCR4 and CXCR7 may not be restricted to glomerulosclerosis. Tubular cell damage is a common finding in biopsies of patients with renal disease. Progressive glomerular and tubular injury may lead to tubular atrophy and capillary rarefaction and finally fibrosis of the kidney.

Necrosis of the proximal tubular epithelial cells with detachment from the basement membrane as well as the rapid loss of the proximal tubular brush border and the formation of tubular casts due to tubular debris results in a loss of cellular polarity and loss of cell function because proximal tubule cells require attachment to the basement membrane to be totally integrated into the tubule. This loss of cell function is one of the major key players in the pathogenesis of renal functional failure and has to be restored to maintain kidney function. It is widely known that the proximal tubule has the capacity to undergo regeneration after acute kidney injury. But what mechanism or cell drives repair and regeneration of the proximal tubule after injury?

Tubular cell injury is followed by a strong upregulation of SDF-1, CXCR4 and CXCR7 expression in proximal tubular cells (12-14). SDF-1 signalling presumably promotes cell survival and regeneration since partial inhibition of SDF-1 has shown to hinder regeneration of proximal tubular cells (9). Both, glomerular disease and tubular damage are accompanied by loss of functional capillaries and local hypoxia. Hypoxia causes increased expression of several proteins including SDF-1 and its receptors (11, 15), which have the potential to promote neovascularization (16).

We hypothesize that upregulation of SDF-1 and its receptors is essential for proximal tubule regeneration and plays an important role in promoting neovascularization.

Based on the literature and the hypotheses outlined above, it is clear that inhibition of SDF-1 signalling may have advantageous and disadvantageous effects. Nevertheless, the SDF-1/CXCR4/CXCR7-axis represents a promising therapeutic target which requires more detailed studies. Most importantly, the cell-specific and disease stage-dependent effects need to be clarified. In the current proposal we use state of the art conditional knock-out mouse models that allow the study of SDF-1 mediated effects in a cell-specific and time dependent manner.

The studies proposed in this project were described in scientific grant proposals that have been awarded with the prestigious Vidi award from the Talent Scheme of The Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO) and a grant from the Dutch Kidney foundation.

(1) J. Case, S. Khan, R. Khalid, A. Khan, Epidemiology of acute kidney injury in the intensive care unit, Critical care research and practice, 2013 (2013) 479730.

(2) S. Uchino, J.A. Kellum, R. Bellomo, G.S. Doig, H. Morimatsu, S. Morgera, M. Schetz, I. Tan, C. Bouman, E. Macedo, N. Gibney, A. Tolwani, C. Ronco, Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study, Jama, 294 (2005) 813-818.

- (3) L.S. Chawla, R.L. Amdur, S. Amodeo, P.L. Kimmel, C.E. Palant, The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease, *Kidney international*, 79 (2011) 1361-1369.
- (4) A. Zarjou, A. Agarwal, Sepsis and acute kidney injury, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 22 (2011) 999-1006.
- (5) Levey AS, Coresh J: Chronic kidney disease. *Lancet* 379:165-180, 2012
- (6) Grgic I, Campanholle G, Bijol V, Wang C, Sabbisetti VS, Ichimura T, Humphreys BD, Bonventre JV: Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 82:172-183, 2012
- (7) Palm F, Nordquist L: Renal tubulointerstitial hypoxia: cause and consequence of kidney dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38:474-480, 2011
- (8) Steegh FM, Gelens MA, Nieman FH, van Hooff JP, Cleutjens JP, van Suylen RJ, Daemen MJ, van Heurn EL, Christiaans MH, Peutz-Kootstra CJ: Early loss of peritubular capillaries after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 22:1024-1029, 2011
- (9) Kida Y, Tchao BN, Yamaguchi I: Peritubular capillary rarefaction: a new therapeutic target in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 29:333-342, 2014
- (10) Chen LH, Advani SL, Thai K, Kabir MG, Sood MM, Gibson IW, Yuen DA, Connelly KA, Marsden PA, Kelly DJ, Gilbert RE, Advani A: SDF-1/CXCR4 Signaling Preserves Microvascular Integrity and Renal Function in Chronic Kidney Disease. *PLoS One* 9:e92227, 2014
- (11) Takabatake Y, Sugiyama T, Kohara H, Matsusaka T, Kurihara H, Koni PA, Nagasawa Y, Hamano T, Matsui I, Kawada N, Imai E, Nagasawa T, Rakugi H, Isaka Y: The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Axis Is Essential for the Development of Renal Vasculature. *J Am Soc Nephrol* 2009
- (12) Floege J, **Smeets B**, Moeller MJ: The SDF-1/CXCR4 axis is a novel driver of vascular development of the glomerulus. *J Am Soc Nephrol* 20:1659-1661, 2009
- (13) Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T: The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393:591-594, 1998
- (14) Memi F, Abe P, Cariboni A, Mackay F, Parnavelas JG, Stumm R: CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) affects the migration of GnRH neurons by regulating CXCL12 availability. *J Neurosci* 33:17527-17537, 2013
- (15) Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleswar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M: CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One* 5:e9175, 2010

- (16) Van RC, Rood BR, Touka M, Pinte S, Jenal M, Guerardel C, Ramsey K, Monte D, Begue A, Tschan MP, Stephan DA, Leprince D: Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). *J Biol Chem* 284:20927-20935, 2009
- (17) Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, renzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA: Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121:335-348, 2005
- (18) Addadi Y, Moskovits N, Granot D, Lozano G, Carmi Y, Apte RN, Neeman M, Oren M: p53 status in stromal fibroblasts modulates tumor growth in an SDF-1-dependent manner. *Cancer Res* 70:9650-9658, 2010
- (19) Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E: VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124:175-189, 2006
- (20) Stokman G, Stroo I, Claessen N, Teske GJ, Florquin S, Leemans JC: SDF-1 provides morphological and functional protection against renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant* 25:3852-3859, 2010
- (21) Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Liu C, Zhang QY, Kraus C, Zeeshan AM, Firdous M, Klinakis A, Efstratiadis A, Al-Awqati Q: SDF-1 activates papillary label-retaining cells during kidney repair from injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 302:F1362-F1373, 2012
- (22) Ding M, Cui S, Li C, Jothy S, Haase V, Steer BM, Marsden PA, Pippin J, Shankland S, Rastaldi MP, Cohen CD, Kretzler M, Quaggin SE: Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med* 12:1081-1087, 2006
- (23) Wang A, Fairhurst AM, Tus K, Subramanian S, Liu Y, Lin F, Igarashi P, Zhou XJ, Batteux F, Wong D, Wakeland EK, Mohan C: CXCR4/CXCL12 hyperexpression plays a pivotal role in the pathogenesis of lupus. *J Immunol* 182:4448-4458, 2009
- (24) Sayyed SG, Hagele H, Kulkarni OP, Endlich K, Segerer S, Eulberg D, Klussmann S, Anders HJ: Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 52:2445-2454, 2009
- (25) Darisipudi MN, Kulkarni OP, Sayyed SG, Ryu M, Migliorini A, Sagrinati C, Parente E, Vater A, Eulberg D, Klussmann S, Romagnani P, Anders HJ: Dual blockade of the homeostatic chemokine CXCL12 and the proinflammatory chemokine CCL2 has additive protective effects on diabetic kidney disease. *Am J Pathol* 179:116-124, 2011
- (26) Wang A, Guilpain P, Chong BF, Chouzenoux S, Guillevin L, Du Y, Zhou XJ, Lin F, Fairhurst AM, Boudreaux C, Roux C, Wakeland EK, Davis LS, Batteux F, Mohan C: Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62:3436-3446, 2010
- (27) Douglas MR, Morrison KE, Salmon M, Buckley CD: Why does inflammation persist: a dominant role for the stromal microenvironment? *Expert Rev Mol Med* 4:1-18, 2002

- (28) Moeller MJ, **Smeets B**: Role of parietal epithelial cells in kidney injury: the case of rapidly progressing glomerulonephritis and focal and segmental glomerulosclerosis. *Nephron Exp Nephrol* 126:97, 2014
- (29) Shankland SJ, **Smeets B**, Pippin JW, Moeller MJ: The emergence of the glomerular parietal epithelial cell. *Nat Rev Nephrol* 10:158-173, 2014
- (30) Moeller MJ, **Smeets B**: Novel target in the treatment of RPGN: the activated parietal cell. *Nephrol Dial Transplant* 28:489-492, 2013
- (31) **Smeets B**, Kuppe C, Sicking EM, Fuss A, Jirak P, van Kuppevelt TH, Endlich K, Wetzels JF, Grone HJ, Floege J, Moeller MJ: Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 22:1262-1274, 2011
- (32) **Smeets B**, Uhlig S, Fuss A, Mooren F, Wetzels JF, Floege J, Moeller MJ: Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 20:2604-2615, 2009
- (33) Dijkman H, **Smeets B**, van der Laak J, Steenbergen E, Wetzels J: The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 68:1562-1572, 2005
- (34) Rizzo P, Perico N, Gagliardini E, Novelli R, Alison MR, Remuzzi G, Benigni A: Nature and mediators of parietal epithelial cell activation in glomerulonephritides of human and rat. *Am J Pathol* 183:1769-1778, 2013
- (35). Pro B, Dang NH: CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol* 19:1345-1351, 2004
- (36) Tauc M, Chatelet F, Verroust P, Vandewalle A, Poujeol P, Ronco P: Characterization of monoclonal antibodies specific for rabbit renal brush-border hydrolases: application to immunohistological localization. *J Histochem Cytochem* 36:523-532, 1988
- (37) Min HS, Kim JE, Lee MH, Song HK, Kang YS, Lee MJ, Lee JE, Kim HW, Cha JJ, Chung YY, Hyun YY, Han JY, Cha DR: Dipeptidyl peptidase IV inhibitor protects against renal interstitial fibrosis in a mouse model of ureteral obstruction. *Lab Invest* 94:598-607, 2014
- (38) Glorie LL, Verhulst A, Matheeußen V, Baerts L, Magielse J, Hermans N, D'Haese PC, De M, I, De BA: DPP4 inhibition improves functional outcome after renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 303:F681-F688, 2012
- (39) Vaghasiya J, Sheth N, Bhalodia Y, Manek R: Sitagliptin protects renal ischemia reperfusion induced renal damage in diabetes. *Regul Pept* 166:48-54, 2011
- (40) Jungraithmayr W, De M, I, Matheeußen V, Baerts L, Arni S, Weder W: CD26/DPP-4 inhibition recruits regenerative stem cells via stromal cell-derived factor-1 and beneficially influences ischaemia-reperfusion injury in mouse lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 41:1166-1173, 2012

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 major goal is to define the intrinsic pathways and signals of kidney epithelial cells that regulate the response and phenotypic changes facilitating cell survival and repair of the kidney epithelial cells and its microvasculature during an episode of kidney injury. In this proposal we will study the importance of SDF-1 signaling in the processes of kidney disease and repair. Ultimately the gained knowledge will be used to identify therapeutic targets that can be used to intervene in the pathological processes or to stimulate kidney regeneration.

More specifically, within this proposal we address important questions within four key objectives which are described in detail in 3.4.2. basic outline of the research strategy:

Key objective 1: What is the expression of SDF-1/CXCR4/CXCR7 in the kidney and in human and experimental kidney disease?

Key objective 2: Is SDF-1 a key mediator of parietal epithelial cell activation and associated proliferation and matrix production in glomerulosclerosis? If so by which receptor (CXCR4 or CXCR7) are the observed effects mediated?

Key objective 3: Is SDF-1 essential for tubular epithelial cell survival and regeneration in tubular injury? If so by which receptor (CXCR4 or CXCR7) are the observed effects in tubular injury mediated?

Key objective 4: Is SDF-1 essential for the integrity of the kidneys microvasculature and does prolonged expression of SDF-1 lead to increased inflammation of the kidney or progression of kidney fibrosis?

We think that our aims are innovative and feasible. The application of genetically engineered mouse models, i.e. podocyte- and tubular cell- specific inducible knock-out mice is cutting-edge technology. By applying these different highly sophisticated mouse models we can unravel the role of SDF-1 signaling in glomerulosclerosis, tubular injury/regeneration as well as in maintenance and regeneration of the vascular structures. The conditional KO mouse lines are described in detail in 3.4.1. Research strategies.

3.3 Relevance

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

Societal relevance

World-wide millions of people are affected by renal diseases, in particular acute kidney injury (AKI) and chronic kidney injury (CKD) which often progresses to End-Stage Renal Disease (ESRD). In the Netherlands, 10% of the Dutch population has chronic kidney injury (1.7 million people). However, 40% of them (680,000 people) are not aware of this injury as complaints often only arise when the renal function has declined to 30%. People with chronic kidney injury have an increased risk of kidney failure, and death from cardiovascular disease. More than 60,000 people have severe kidney failure, and approximately 16,000 of these need renal replacement therapy. There is an unmet need for specific treatment modalities to prevent or treat AKI and CKD, in order to reduce the number of patients with ESRD. More knowledge on the molecular processes involved in the aetiology and progression of renal damage is essential in order to identify specific targets for treatment.

Glomerulosclerosis, scarring of the glomerulus, is a hallmark lesion in CKD and is the leading cause for progression towards the final stage of CKD, ESRD. There are many different underlying diseases that may lead to glomerulosclerosis. The molecular pathways involved in kidney damage and progressive glomerulosclerosis are currently still undefined. Treatment of patients with glomerulosclerosis is therefore mainly supportive (reduction in blood pressure and proteinuria) and not focused on a specific underlying cause or molecular process.

Recent findings by our group and others showed that independent of the underlying aetiology, glomerulosclerosis is always associated with scar formation by PECs. Thus, the pro-fibrotic activation of PECs represents a common principal mechanism in glomerulosclerosis. Identifying the underlying molecular mechanisms could lead to identification of novel effective and highly specific therapeutic approaches.

The results of this project might be used to attenuate glomerulosclerosis by targeting the PECs specifically.

Chronic kidney disease is also a common clinical problem characterized by injured tubular cells and microvascular damage. When tubular and vascular damage is not properly repaired, it may lead to renal fibrosis (interstitial tubular fibrosis/tubular atrophy) and loss of renal function.

Currently, it remains unclear how the kidney regenerates from such injuries and why this sometimes fails and results in chronic renal failure. Understanding of the mechanisms that contribute to the maintenance and/or regeneration of tubular cells and the renal microvasculature may lead to the development of new therapeutic strategies, which will be beneficial for many patients.

Scientific relevance

The project will reveal knowledge of the regulators of kidney epithelial and endothelial cell regeneration:

Ultimately, the ones to benefit from our research are hopefully patients with kidney disease. In order to lead to improved patient care, our research should reach the following target groups:

- Scientific community: This target group can be best informed through publications in high impact journals and presentations at international congresses (Kidney Week of the American Society of Nephrology, World Congress of Nephrology, Dutch and German annual Nephrology conferences).
- Clinicians treating kidney disease patients: As we are working at an academic hospital that combines high level patient care with top biomedical research and also as a member of the Renal Disorder theme of the Radboud institute of Molecular Life Sciences (RIMLS), we are perfectly positioned to enable the translation of research results in terms relevant to clinicians and (as this proposal exemplifies) the other way around: to translate pressing clinical questions in innovative research solutions. The translation of our research to the clinic will benefit from the direct collaboration in this project with expert nephrologists in The Netherlands and in Germany.

3.4 Research Strategy

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

Epithelial cells of the kidney are like epithelial cells of the liver and the pancreas, self-renewing at a low rate compared to the epithelial cells in the skin or intestine. However, the quiescent epithelial cells of the kidney are activated during the regenerative response following injury. This activation of the epithelial cells is associated with the activation of a transcriptional program leading to phenotypic changes and dedifferentiation of the epithelial cells facilitating their survival, migration and proliferation. It is a prerequisite and our aim to define and understand the intrinsic and extrinsic signal(s) of epithelial cell regeneration after kidney injury.

As described in the background description of this proposal there are strong indications, based on findings described in the literature and preliminary studies in human biopsies and cell culture, for an important role of the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in kidney regeneration. To investigate the role of

the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis, we will study the cell specific effects at different time points (e.g. early disease and late advanced disease). The significance of a particular molecule can be tested in knock-out (KO) mice. However SDF-1 and CXCR4 knock-out (KO) mice are lethal. Therefore, functional testing of the importance of the SDF-1/CXCR4/CXCR7-axis in KO mice was only possible during embryogenesis and early organ development. Therefore, the precise role of the SDF-1/CXCR4/CXCR7-axis in the (patho)physiology of injury in fully developed tissues/organs including the kidney, remains largely unknown.

In the current project we will use a recently generated transgenic mouse in which the SDF-1 gene was interposed between two LoxP sites (SDF-1fl/fl), which permits deletion of the SDF-1 gene in mice expressing Cre recombinase (38). To delete SDF-1 expression specifically in either PECs, podocytes or proximal tubule cells, we will crossbreed the SDF-1fl/fl mice with respective mice that express Cre exclusively in the epithelial cells of the nephron (PAX8-rtTA), or podocytes (Pod-rtTA/LC1). The Cre expression is conditional and is induced by doxycycline (DOX) (Tet-On system) or tamoxifen. These cell-specific knock-out models will also be used for knockout of the responsible receptors CXCR4 and CXCR7.

Using the outlined mice, we will for the first time be able to study the cell specific functions of SDF-1 in a time-dependent (disease stage dependent) manner in the (patho)physiology of fully developed kidneys and we will be able to determine if pharmacological targeting of this pathway will be important for better disease outcome in patients with kidney diseases.

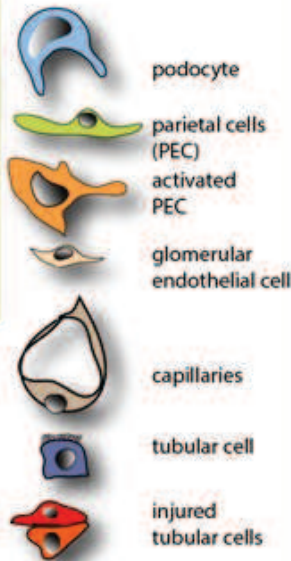
3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

To enhance our understanding of the role of the SDF-1 pathway in health and disease, we first want to evaluate the expression of SDF-1/CXCR4/CXCR7 in human and experimental renal disease (Key objective 1). Because of the complexity of the nephron, which is the functional unit of the kidney and also because of the great cell heterogeneity, it is of most importance to unravel the effect of the SDF-1 pathway during kidney injury for the different nephron segments. As SDF-1 could have different effects on disease progression and regeneration after renal injury dependent on the underlying disease as outlined in detail in the background description of this project proposal, we want to study the effects of SDF-1/CXCR4/CXCR7 knock-out during experimental glomerular injury (Key objective 2) as well as tubular injury (Key objective 3). It is known that progressive glomerular and tubular injury may lead to tubular atrophy and capillary rarefaction and finally fibrosis of the kidney. Because of this, all kidney tissue from the animal experiments will be analysed for inflammation, fibrosis and microvascular integrity (Key objective 4). In figure 1, an overview of a nephron is given, regarding the different pathological mechanisms inside the glomerulus (1: SDF-1 signalling in glomerulosclerosis, Key objective 1, 2 and) and the tubular system (2: SDF-1 signalling in tubular injury, Key objective 1, 3 and 4). Unravelling the role of SDF-1 and its receptors during these renal pathologies will provide us with important information to detect possible therapeutic treatments (e.g. activation or inhibition of the SDF-1 pathway) which could be tested in a follow-up study (3. Therapeutic interventions).

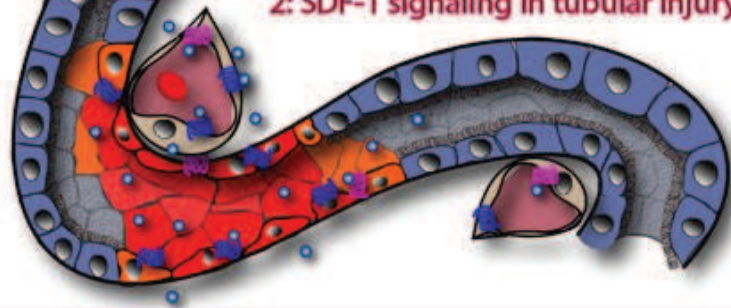
1: SDF-1 signaling in glomerulosclerosis



3: Therapeutic interventions



2: SDF-1 signaling in tubular injury



Schematic illustration and background information about SDF-1 signaling that will be studied in the two different animal procedures. **1: SDF-1 signaling in the glomerulus** and **2: SDF-1 signaling in tubular injury**. Results from these experiments will help us to create possible follow up studies: **3: Therapeutic interventions**.

1: SDF-1 signaling in the glomerulus (Key objective 1, 2 and 4) In healthy glomeruli SDF-1 is expressed by the podocytes and proposed to interact in a paracrine fashion with the CXCR4 positive glomerular endothelial cells and autocrine with the CXCR7 receptor on the podocytes. We hypothesize that this signaling is important for the glomerular integrity, function and regeneration after injury. In glomerulosclerosis activated PECs show an upregulated expression of the receptors. The increased signaling within these PECs may induce PEC activation/proliferation and or migration and subsequent sclerosis of the glomerulus.

2: SDF-1 signaling in tubular injury (Key objectives 1, 3 and 4) In tubular damage the injured tubular cells show an increased expression of SDF-1, CXCR4 and CXCR7. It has been proposed that SDF-1 mediated signaling is important for tubular cell survival and regeneration of the tubular cells but also the juxtaposed capillaries. On the other hand increased and prolonged SDF-1 signaling may lead to increased inflammation and fibrosis of the kidney.

3. Therapeutic interventions (possible follow-up study) Inhibition of SDF-1 or the receptors may attenuate development of glomerulosclerosis and kidney inflammation and fibrosis. Stimulation of the signaling may stimulate the regeneration of tubuli and kidney vasculature. We believe that intervention in SDF-1 signaling is dependent on the type of injury (glomerular/tubular) and on the stage of the disease.

Key objective 1. Evaluate the expression of SDF-1/CXCR4/CXCR7 in human and experimental renal disease (animal procedures 1 and 2).

The expression of the SDF-1/CXCR4/CXCR7-axis components will be analysed at the protein level using immunohistochemistry on kidney sections of patients with acute and progressive chronic renal failure. For comparison we will use renal tissues from 10 normal human kidneys. To identify the best mouse model to study SDF-1 signalling, the human data will be compared to the expression of SDF-1, CXCR4, and CXCR7 that is examined in experimental animal models of glomerulosclerosis (animal procedure 1): (i) anti-Thy-1.1 mouse model (ii) Adriamycin model, and in models of tubular injury (animal procedure 2) (iii) Ischemia reperfusion (I/R) model and (iv) glycerol model. All four models are established models of CKD and develop kidney fibrosis and inflammation. We have experience with all four models. In addition, we will study the expression of SDF-1 in SDF-1-DsRed reporter mice, which will allow sensitive analysis of expression of SDF-1 in time and in location.

These experiments will provide us with the important information to find out which animal models of glomerular and tubular disease resembles best the human situation in regard to SDF-1 signalling. In addition, this experiment will provide information at which time point in disease SDF-1 expression is altered in response to the underlying disease (see flow schema 1).

Dependent on these findings, the best suitable models with the greatest effect on SDF-1 (and receptor CXCR4 and CXCR7) expression during experimental disease will be chosen to continue with Key objective 2 and Key objective 3 (**GO/NO GO decision**). Furthermore, the best time points for knock-out of the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis during glomerulosclerosis and tubular injury will be determined. This reduces the amount of groups needed for the experiments regarding Key objective 2 and Key objective 3.

Flow schema 1: Schematic illustration of Key objective 1:

Key Objective 1:

Determine the expression of SDF-1 and its receptors during experimental disease



Thy1.1. model

Adriamycin model

Glycerol model

I/R model

1. Choose animal model

2. Determine exact time points of changes in SDF-1/CXCR4/CXCR7 expression during disease



Key Objective 2:

Evaluate the role of the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in glomerulosclerosis

Key Objective 3:

Evaluate the role of the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in tubular injury

Key objective 2. Evaluate the role of SDF-1/CXCR4/CXCR7-axis in glomerulosclerosis (animal procedure 1).

To study the role of SDF-1 in the development of glomerulosclerosis, we will generate a podocyte specific SDF-1 conditional knock-out (KO) mice, which allows SDF-1 knock-out upon doxycycline treatment. Established colonies of podocyte-rtTA/LC1 transgenic mice are available and present in the animal facility of the Radboudumc and have been used successfully in our previous studies. First of all the expression of SDF-1 after doxycycline treatment to knock-out SDF-1 will be analysed and compared to wild type mice. Of note, only if the expression of SDF-1 is reduced significantly within the glomeruli of the kidneys the mice will be suitable for further studies **(GO/NO GO Decision)**.

In these mice, glomerulosclerosis will be induced and SDF-1 expression will be inactivated shortly before it becomes upregulated in disease. The exact time point has been established under Key objective 1. Non-transgenic littermates and/or animals that do not receive doxycycline to induce cell-specific gene inactivation will serve as controls for the experiments. This allows us to answer if SDF-1 is a key mediator of parietal epithelial cell activation and associated proliferation and matrix production in glomerulosclerosis. Only if significant effects of SDF-1 knock-out during experimental glomerulosclerosis are observed, the same procedures will be performed with CXCR4 and CXCR7 conditional KO mice to determine which receptor pathway is responsible for the observed effects **(GO/NO GO-Decision)**

To test which receptor pathways mediate the effects of SDF-1 in the development of glomerulosclerosis, mice in which the PECs or podocytes are deficient for CXCR4 or CXCR7 will be analysed. These mice are crossbreds of the PAX8-Cre mice or Pod-rtTA mice and the CXCR4fl/fl and/or CXCR7fl/fl mice. This will lead to deletion of the CXCR4 and/or CXCR7 gene in all epithelial cells of the nephron including the PECs. The efficiency of the knock out will be verified by real time PCR and Western blot analysis of isolated PECs as well as histological analysis. Also in these mice development of glomerulosclerosis will be induced. Littermates lacking the Cre transgene will serve as controls for the experiment. This will allow us to answer via which receptor (CXCR4 or CXCR7) the observed effects in experimental glomerulosclerosis are mediated. The experiments of this key objective are shortly summarized in flow schema 2.

Flow schema 2: Schematic illustration of Key objective 2:

Key Objective 2:

Evaluate the role of the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in glomerulosclerosis



1. Validation of SDF-1 knock-out efficiency



No efficient knock-out of SDF-1
(NO GO Decision)



Efficient knock-out of SDF-1
(GO Decision)

2. Knock-out of SDF-1 during experimental glomerulosclerosis



No significant effects regarding
disease progression
(NO GO Decision)



Significant effects regarding
disease progression
(GO Decision)

3. Repeat experiments for receptor (CXCR4/CXCR7) knock-out

Key objective 3. Evaluate the role of SDF-1 in tubular cell regeneration (animal procedure 2)

Tubular cell damage is accompanied by an increased expression of SDF-1. In order to be able to study the relevance of the tubular SDF-1 expression, a conditional nephron-specific SDF-1 knock out (KO) mouse will be generated. This mouse allows inducible nephron-specific SDF-1 knock-down upon doxycycline treatment. For this purpose SDF-1 floxed (SDF-1^{fl/fl}) mice will be crossed with the tubule cell promoter mouse. First of all the expression of SDF-1 after doxycycline treatment to knock-out SDF-1 will be analysed and compared to wild type mice. Of note, only if the expression of SDF-1 is reduced significantly within the glomeruli of the kidneys the mice will be suitable for further studies **(GO/NO GO Decision)**.

In these mice, tubular cell injury will be induced using for example the I/R model and/or the glycerol-induced model (depended on the findings of Key objective 1). SDF-1 deficiency will be induced prior to observed changes in the expression of SDF-1 upon disease induction (based on the findings of Key objective 1). Non-transgenic littermates and/or animals that had not received doxycycline will serve as controls. This will allow us to answer if SDF-1 is essential for tubular epithelial cell survival and regeneration in tubular injury. Only if significant effects of SDF-1 knock-out during experimental tubular injury are observed, the same procedures will be performed with CXCR4 and CXCR7 conditional KO mice to determine which receptor pathway is responsible for the observed effects **(GO/NO GO-Decision)**.

To test which receptor pathways mediate the effects of SDF-1 in tubular cell injury and regeneration, CXCR4 or CXCR7 deficiency will be induced. These mice are crossbreds of conditional nephron specific mice and the CXCR4^{fl/fl} and/or CXCR7^{fl/fl} mice. This will lead to deletion of the CXCR4 and/or CXCR7 gene in our cells of interest. The efficiency of the knock out will be verified by real time PCR and Western blot analysis of isolated proximal tubule cells as well as histological analysis. Also in these mice tubular injury will be induced. Littermates lacking the Cre transgene will serve as controls for the experiment. This will allow us to answer via which receptor (CXCR4 or CXCR7) the observed effects in tubular injury are mediated. The experiments of this key objective are shortly summarized in flow schema 3.

Flow schema 3: Schematic illustration of Key objective 3:

Key Objective 3:

Evaluate the role of the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in tubular injury



1. Validation of SDF-1 knock-out efficiency



No efficient knock-out of SDF-1
(NO GO Decision)



Efficient knock-out of SDF-1
(GO Decision)

2. Knock-out of SDF-1 during experimental tubular injury



No significant effects regarding
disease progression
(NO GO Decision)



Significant effects regarding
disease progression
(GO Decision)

3. Repeat experiments for receptor (CXCR4/CXCR7) knock-out

Key objective 4: The effects of SDF-1/CXCR4 and CXCR7 knockout on inflammation and fibrosis after injury and on the microvascular integrity

Kidney injury (glomerular as well as tubular injury) is accompanied by increased inflammation, progression of kidney fibrosis and goes hand in hand with loss of microvascular integrity. Therefore, all tissue derived from the experiments of key objective 2 and key objective 3 will additionally be scored for inflammation, fibrosis and microvascular integrity to determine the role of SDF-1 in disease progression.

To analyse the effect of SDF-1 knock-down on inflammation and fibrosis of the kidney, biomarker analysis for tubular injury will be performed and the expression of KIM-1 and vimentin will be assessed by immunohistochemistry. It will be scored for the degree of tubular atrophy and interstitial fibrosis. Furthermore, the effects of influx of inflammatory cells will be examined in the early phase as well as the late phase of the injury models. The number of inflammatory cells (PMNs, macrophages and T cells) will be examined by immunohistochemistry with specific markers and by FACS analysis of kidney suspensions.

Additionally, the integrity of the endothelial cells, including their glycocalyx, will be analysed at the ultrastructural level using electron microscopy (EM). The number of proliferating (Ki-67 staining) and apoptotic endothelial cells (TUNEL assay and Caspase-3 staining) will be quantified as well. Furthermore, the number of capillaries in CD31/CD34 double immunostained kidney sections will be determined. The glycocalyx will be analysed using glycocalyx-specific probes and techniques available at the Department of Nephrology. This will allow us to answer if SDF-1 is essential for the integrity of the kidneys microvasculature.

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

The four key objectives described in 3.4.2 are complementary in gaining more insight in the role of the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in the pathophysiological processes of kidney disease. Because of the fact that SDF-1 acts on different cell types (PECs, podocytes, proximal tubular cells,

endothelial cells) and could play a role in different pathophysiological conditions (glomerulosclerosis, microvascular integrity, tubular damage, fibrosis), the analysis of all four subparts is necessary to get a full understanding of the importance of this axis in health and disease. Together, the results will enhance our understanding on the role of the SDF-1 axis in the kidney in health, disease, repair and regeneration. All four key objectives are necessary to address different parts of the pathophysiology in kidney injury and are important to understand the role SDF-1 plays for each cell type and type of injury. Therefore, all topics must be analysed to contribute to a full understanding of the importance of this axis and to answer the general research goal. Also this study is aimed to find possible new pharmaceutical targets to facilitate regeneration and repair and inhibit the progression of the disease which could be tested in a follow-up study.

Importantly, the different sub-projects depend on each other with GO/NO GO-Decisions wherever possible.

The four key objectives of this project will allow us to approach the research question from different angles. In the end, we expect that the results will synergize with each other and provide us with a broader view on how the SDF-1 axis is involved in maintaining structure and function of renal structures in health and disease.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	SDF-1 signaling in glomerulosclerosis
2	SDF-1 signalling in tubular injury and regeneration

Appendix Description animal procedures

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

1 General information

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

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 aims of this animal procedure are to determine the expression profile of SDF-1 and its receptors in mouse models of glomerulosclerosis (Aim 1) and to investigate the role of SDF-1 signalling in glomerular function (Aim 2) as well as pathology (glomerulosclerosis) (Aim 3). These aims belong to Key objective 1, 2 and 4.

Aim 1) The expression profile of SDF-1 and its receptors in glomerular diseases

Renal diseases are frequently characterized by glomerulosclerosis. One hallmark which goes hand in hand with tubular and glomerular injury is the rarefaction of the renal microvasculature. SDF-1 is a proposed candidate to hinder the scarring of the glomerulus and maintain the microvascular structures. The aim of this procedure is to unravel the role of SDF-1 and its receptors in the kidney in health and disease.

To determine the expression of SDF-1 and CXCR4 as well as CXCR7 in the pathology of glomerulosclerosis, different models of kidney disease will be used to compare the expression profile of SDF-1 and its receptors with the healthy situation. SDF-1 is not easy to detect in tissue using commercially available antibodies, therefore a SDF-1-DSRed reporter mouse will be useful to validate the expression of SDF-1 and enable us to study the cellular source of SDF-1 in health and disease. The targeted mutated DSRed reporter mouse express DSRed from the endogenous SDF-1 promoter, which makes this strain useful in marking cellular sources of SDF-1, as the bright fluorescence can be detected either directly or through anti-RFP (Red-fluorescent protein) immunohistochemistry. Only heterozygous mice will be bred as complete knock-out of SDF-1 during the developmental stage results in a lethal phenotype. The heterozygous mice that we will use for this study have no reported phenotype or signs of discomfort (own observations). CXCR4 and CXCR7 can be stained in mouse tissue using commercially available antibodies. Therefore, the expression of CXCR4 and CXCR7 will be analysed in wild type animals. As the expression of both receptors can be examined in the same tissue, less animals are needed.

To study the expression of SDF-1, CXCR4 and CXCR7 in glomerulosclerosis in mice, we will use different models for scarring of the glomerulus in mice (e.g. the Adriamycin model or Thy1.1. model). Expression of SDF-1 and its receptors will be determined in the kidney tissue at different time points after induction of the disease.

Aim 2) The role of SDF-1 signalling in glomerular function.

2.1. For this purpose, SDF-1^{fl/fl} mice will be crossed with the podocyte reporter mouse (podocyte-rtTA-LC1 transgenic mouse). In these mice we will be able to stop SDF-1 expression in podocytes when mice are treated with doxycycline. First of all, we will validate the efficiency of the SDF-1 knock-out mouse using immunohistochemistry and methods for RNA and protein detection. Only if the expression of SDF-1 is reduced significantly within the glomeruli of the kidneys the mice will be suitable for further studies **(GO/NO GO Decision)**.

2.2 To study the role of SDF-1 in glomerular capillary maintenance we will treat 6 week old mature mice with doxycycline to knock-out SDF-1 expression within the podocytes. These mice will be monitored for the development of proteinuria and loss of renal function (e.g. serum cystatin C ELISA) and kidneys will be sampled for (immune)histological analysis on (ultra)structural level.

In the mature glomeruli, we will assess in particular the effects of SDF-1 deficiency on the integrity of the glomerular capillaries. The phenotype of the endothelial cells will be examined on ultrastructural level using electron microscopy but also by immunostaining for specific markers normally expressed by endothelial cells i.e. CD31, and PV-1. The latter marker is normally not expressed in the glomerular capillaries but strongly expressed by damaged and immature glomerular endothelial cells in models of glomerular injury (unpublished observation). The data obtained in the conditional KO mice will be compared to mice that are wild type for the target SDF-1 floxed gene.

Aim 3) The role of SDF-1 signalling in glomerulosclerosis.

3.1. To study the role of SDF-1 in the development of glomerulosclerosis, we will use again the podocyte specific SDF-1 conditional knock-out (KO) mice. In the conditional KO mice glomerulosclerosis will be induced using for example the Adriamycin model. SDF-1 expression will be inactivated shortly before induction of the disease model. Animals that are wild type for the SDF-1 floxed gene will serve as controls for the experiments. At e.g. four different time points (after e.g. 1, 2, 3 and 4 weeks) , the mice will be sacrificed. Those time points were determined in aim 1 and the efficiency of the knock-out was already established in aim 2.1. All animals will be analysed for renal function parameters (proteinuria, albuminuria, serum creatinine levels), and for glomerular injury and glomerulosclerosis as main histological outcome parameters.

3.2. If significant effects on disease progression in the SDF-1 podocyte specific conditional knock-out mice can be detected (in aim 3.1) **(GO/No GO-decision)** we will test which receptor pathways mediate the effects of SDF-1 in glomerulosclerosis. Therefore, mice in which the PECs are deficient for CXCR4 or CXCR7 will be analysed. These mice are crossbreds of the PAX8-Cre mice and the CXCR4^{fl/fl} and/or CXCR7^{fl/fl} mice. This will lead to

deletion of the CXCR4 and/or CXCR7 gene in all epithelial cells of the nephron including the PECs. Furthermore, it is known that CXCR7 is highly expressed on podocytes but the main role of this receptor in the pathogenesis of glomerulosclerosis remains unclear. Therefore, also podocyte specific CXCR7 knockout mice will be created by crossbreeding of the Pod-rtTA mice and the CXCR7^{fl/fl} mice. First of all, the efficiency of these knock-out mice will be evaluated by immunohistochemistry as well as methods for RNA and protein detection. Only if the expression of SDF-1, CXCR4 or CXCR7 is reduced significantly within the glomeruli of the kidneys the mice will be suitable for further studies **(GO/NO GO Decision)**.

3.3 In these knock-out mice, glomerulosclerosis will be induced using Adriamycin or the Thy1.1. transgenic mouse model (determined in Aim 1) and the same parameters as described above for the SDF-1 conditional KO mice will be examined.

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

Experiment 1. Determination of the expression of SDF-1 and its receptors in models of glomerulosclerosis (project proposal, key objective 1).

To address the difference in pathologies that may lead to glomerulosclerosis we will also use different but well established models of glomerulosclerosis. For this, we will use two different models of glomerulosclerosis, i.e. (a) the adriamycin model that is based on toxic injury to the glomerular epithelial and endothelial cells leading to scarring of the glomerular tuft and (b) the Thy-1.1. transgenic mouse model that is based on primary podocyte injury and subsequent proliferation of parietal epithelial cells. After induction of glomerular injury, we will determine the expression profile of SDF-1 and its receptors in glomerulosclerosis and compare them to the healthy situation. This will enable us to determine the expression level of SDF-1 and its receptors in experimental glomerular disease (aim 1).

a) Adriamycin model

The route of administration of Adriamycin is intravenous via the tail vein. One single injection of e.g. 10 mg/kg Adriamycin can be used to induce glomerular injury. Control mice will be treated with a vehicle. Furthermore, baseline blood will be collected via tail cut and mice will be placed in a metabolic cage for max. 24h to collect baseline urine. After this, mice are allowed to recover which can be followed by another urine collection for 24 hours. After the last urine collection, mice will be sacrificed for blood and tissue collection. As described in earlier studies, Adriamycin induces proteinuria and damage of glomerular filtration structures which can be observed as early as 1-2 weeks after Adriamycin injection and are severe after 4 weeks. Therefore, mice will be sacrificed at a maximum of 4 different time points (for example at day 7, 14, 21 and 28 after Adriamycin injection). Tissues will be collected and analysed for the expression of the SDF-1 axis using histological methods and methods for the quantification of RNA and protein levels. The severity of injury will also be determined using specific injury markers such as vimentin or KIM-1.

b) Thy1.1. model

Another established model to induce glomerulosclerosis is the anti-Thy 1.1 mouse which was successfully used earlier by our group. 5-week-old transgenic mice will receive a single Injection of 1 mg Anti-Thy1.1. antibody in 0.9% saline solution (total volume 0.1 ml). Transgenic mice injected with 0.9% saline solution alone will be used as controls. Furthermore, baseline blood will be collected via tail cut and mice will be placed in a metabolic cage for max. 24h to collect baseline urine. After this, mice are allowed to recover which can be followed by another urine collection for 24 hours. After the last urine collection, mice will be sacrificed for blood and tissue collection. Mice will be sacrificed at a maximum of 4 different time points (for example at day 0, 3, 7 and 21 after injection of the Anti-Thy1.1. antibody). Tissue will be collected and analysed for the expression of the SDF-1 axis using histological methods and methods for the quantification of RNA and protein levels. The severity of injury will also be determined using specific injury markers such as vimentin or KIM-1.

Experiment 2. Characterization of the podocyte-, PEC- and kidney epithelial cell-specific (inducible) knock-out mice for SDF-1 or its receptors (project proposal, key objective 2).

Before we can study the effect of the podocyte specific SDF-1 knockout on kidney function and injury, we need to validate the knockout of SDF-1 in the kidneys of the mice after doxycycline treatment. For this, 6 week old mice will receive doxycycline. We have several years of experience with doxycycline inducible models and know that supplementation of doxycycline to the drinking water is sufficient to induce recombination in these models. After doxycycline treatment there will be a wash-out phase of seven days. This period is needed to minimize systemic concentrations of doxycycline. Two weeks after the doxycycline treatment the mice will be sacrificed and tissues will be collected. The efficiency of the KO will be analysed by mRNA and protein analysis for SDF-1 on isolated glomeruli from the kidney. This experiment will enable us to evaluate the efficiency of the SDF-1 knock-out mice (aim 2.1). Of note, only if the expression of SDF-1 is reduced significantly within the glomeruli of the kidneys the mice will be suitable for further studies (GO/NO GO Decision).

The same procedures will also be performed with for the mice in which we knock-out the receptors for SDF-1, i.e. CXCR4 and/or CXCR7, respectively. This experiment will enable us to evaluate the efficiency of the CXCR4 and CXCR7 knock-out mice (aim 3.2). Of note, only if the expression of CXCR4 or CXCR7 is reduced significantly within the glomeruli of the kidneys the mice will be suitable for further studies (GO/NO GO Decision).

Experiment 3. The role of SDF-1 signalling in glomerular function in health and disease (project proposal, key objective 2 and 4).

Six-week old mice will receive doxycycline via drinking water for 7 days followed by a wash out phase of another 7 days. Wild type mice of the flox gene will serve as a control.

Experiment 3.1 In one group of these doxycycline-treated mice we will study the effect of podocyte specific SDF-1 KO on the normal glomerular function and structural integrity. Therefore, mice will be monitored over time to see if the normal kidney function is affected. At day 0, 7, and 21 and eventually later time points, kidneys will be sampled, and plasma and urine will be collected. If later time points are necessary we will test weekly the urine samples with dipstick urine testing (spontaneous urine flow samples when a mice is handled). Only when dipsticks analysis reveals loss of protein the mice will be placed in a metabolic cage for quantitative assessment of the urine and sacrificed to collect the tissue samples. With this study we will investigate the role of SDF-1 on normal glomerular structure and function (aim 2.2).

Experiment 3.2 In another group of doxycycline-treated mice, we will monitor the effect of SDF-1 knock-out for the progression and development of glomerulosclerosis. These mice will receive Adriamycin or Thy-1.1 antibody as described above (Experiment 1a and 1b, respectively). Baseline blood and urine will be collected and mice will be sacrificed after the last urine collection for tissue collection. Tissue will be analysed for the expression of the SDF-1 axis using histological methods and methods for the quantification of RNA and protein levels. The severity of injury will also be determined using specific injury markers such as vimentin or KIM-1. With this experiment we will be able to determine the importance of SDF-1 on disease progression and development of glomerulosclerosis (aim 3.1). If significant effects in this model can be observed, the same procedures will be performed with CXCR4 and CXCR7 conditional KO mice (Pod-rtTA or PAX8-CRE mice) to determine which receptor pathway is responsible for the observed effects (GO/NO GO-Decision) (aim 3.3).

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

The number of animals needed to reach statistical significance was determined by performing power calculations. For the power calculations of each experiment we determined the coefficient of variation and effect size using data from literature and previous experiments. For the statistical analysis of the final design of each experiment a biostatistician will be consulted.

B. The animals

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

Species: SDF-1tm2.1Sjm/J mice (SDF-1/DSRed mice) and Pod- or PAX8-rtTA mice as well as the Thy1.1. mice model will be used to determine the expression profile of SDF-1 and its receptors in health and disease. Furthermore, SDF-1fl/fl mice will be crossed with the podocyte reporter mouse (podocin-rtTA-LC1 transgenic mouse) or with the PAX8-CRE mice. The same will be done with CXCR4fl/fl and CXCR7fl/fl mice. Both male and female mice will be used, since we do not expect gender differences in the pathology of the renal disease.

Of note: All mice are back-crossed towards the SV129 background for less variation between mice models and more comparable results in the end.

Note: The estimated number of animals only includes the animals needed to perform experiments, not for breeding. The wildtype mice needed to generate the F1 offspring are not included, since they will only be used for breeding.

We will use a mice model as laboratory animal to study the role of SDF-1 and its receptors in kidney disease, because of its similarity to humans regarding kidney development, organisation in different kidney segments, as well as function, such as filtration of proteins by the glomerulus and subsequent reabsorption by the proximal tubules. We will use wildtype mice and various genetically modified strains. Studying the effect of SDF-1 and its receptors in the complex pathophysiological conditions of glomerulosclerosis is not possible in 'lower' species to be considered as sufficiently comparable to the human situation. Therefore, even though not every pathological aspect in mice appears to be directly translatable to the human situation, it is still the best model available. The various genetically modified organisms are needed to study the specific effects of SDF-1 and its receptors in glomerular pathology.

Origin: DSRed/SDF-1 mice were ordered from The Jackson Laboratory. Thy1.1. mice were present at the CDL in Nijmegen. All other mice were derived from Prof. Dr. M.J. Moeller, department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Germany. All mice are bred at the Radboudumc Animal facility in Nijmegen or Overasselt.

Estimated number:

To determine the expression profile of SDF-1 and its receptors in two models of glomerulosclerosis (experiment 1), a group of N=6 mice is needed. The final sample size per group should be adjusted for expected attrition, resulting in N=7 mice per group. The experiment will be performed in DSRed mice and SV129 mice for the Adriamycin model and in the Thy1.1. mice. Analysis of the expression will be performed at a maximum of 4 different time points, resulting in an amount of N=28 mice per model which gives a total amount of N=84 mice for experiment 1.

To test the efficiency of the 5 different (inducible) knock-out lines and appropriate controls, we need a final sample size of N=35 mice for experiment 2.

If the results of experiment 2 are sufficient to continue with experiment 3 (minimal 90% knock-out observed in the glomerulus of SDF-1 or the responsible receptors compared to wild type mice), we will establish in Experiment 3.1 the effects of podocyte specific SDF-1 KO on the normal function and integrity of the glomerulus. The structural integrity and glomerular function will be assessed at i.e. day 0, 7 and 21. The effects will be compared with control mice wt for the SDF-1 floxed gene, resulting in 6 different groups. The groups will be N=8 after correcting for expected attrition. This gives a final sample size of N=48 for experiment 3.1.

In experiment 3.2 we will determine the effects of SDF-1, CXCR4 or CXCR7 knockout in a model of experimental glomerulosclerosis. The development of glomerulosclerosis is induced by Thy1.1. and/or Adriamycin. The Adriamycin model is associated with some variation mainly due the narrow therapeutic index of Adriamycin and also in the Thy1.1. model some variation in disease severity can be expected. Based on the experience in previous experiments we have set the variation coefficient for the models on 15%. The effect size is difficult to determine due to lack of information but however should be 20% or more to be relevant. Power calculation results in N=13 for each group. The final sample size per group should be adjusted for expected attrition which gives a final sample size of N=15 mice per group. We will use maximal four different time points as well as knock-out mice for SDF-1, CXCR4, CXCR7 and a combination of both receptors and compare the pathologic situation with the healthy situation. This gives a maximum final sample size of N=420 mice for experiment 3.2.

In summary, the maximum number of animals which will be used is N=587 mice. Depending on the GO/NO GO Decisions, lower numbers may be expected.

Life stages: Our experiments will preferably be performed in mice younger than 3 months. Mice will not be allowed to grow older than one year. Both female and male mice will be used.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Pod-rtTA/LC1-SDF-1fl/fl	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	89	6-10 weeks
Pod-rtTA/LC1-CXCR7fl/fl	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	65	6-10 weeks

PAX8-rtTA/CRE-CXCR4fl/fl	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	65	6-10 weeks
PAX8-rtTA/CRE-CXCR7fl/fl	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	65	6-10 weeks
PAX8-rtTA/CRE-CXCR4fl/fl-CXCR7fl/fl	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	65	6-10 weeks
SDF-1/DSRed	The Jackson Laboratory	28	6-10 weeks
Thy1.1.	CDL Nijmegen	28	5-8 weeks
SV129	Charles River	28	6-10 weeks
PAX8-rtTA/CRE	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	65	6-10 weeks
Pod-rtTA/LC1	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	89	6-10 weeks

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

A significant part of our research is performed with in vitro cultures using cell-lines. To evaluate the role of SDF-1, we will functionally test the effect of SDF-1 stimulation as well as inhibition on cultured podocytes and parietal epithelial cells under physiological and pathophysiological (toxic and hypoxic) conditions. Different assays to determine cell viability, metabolic activity, cell proliferation and migration will be used. This will provide us with information which can be used for the preparation of the animal experiments. Furthermore, the effects seen in vitro can be compared with the in vivo data. Therefore, we will first test the effects of pathway stimulation and inhibition in vitro to avoid unnecessary animal experiments and to determine which cell type is most susceptible to SDF-1 pathway inhibition/stimulation. However, we still need a whole organism to be able to study and differentiate between the effects of SDF-1 and its receptors on kidney injury. Studying the effect of SDF-1 and its receptors in the complex pathophysiological conditions of glomerulosclerosis is not possible in 'lower' species than mice to be considered as sufficiently comparable to the human situation. Therefore, even though not every pathological aspect in mice appears to be directly translatable to the human situation, it is still the best model available. The various genetically modified organisms are needed to study the cell specific effects of SDF-1 and its receptors in kidney pathology. Also the consequences of inhibition of this axis on kidney function cannot be mimicked in vitro. The mouse is known to resemble renal injury observed in humans and has an adequate size to study the kidney extensively.

Reduction

Prior to each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. Furthermore, phenotype analysis in mice is only applied when genotype analysis confirms mutations in the targeted gene. Also, we strive to make optimal use of the material from each mouse by combining experiments wherever possible. One example is the high amount of different histological parameters which will be analysed after each experiment such as fibrosis, microvasculature and inflammation (see project proposal, outline, key objective 4). This will provide us with information useful to get a broader overview of the pathophysiological role of the SDF-1 pathway without the need to perform new animal experiments. Furthermore, to use tissues optimally we will test our methods and antibodies prior to all experiments on tissues collected in previous experiments. These tissues have been collected and archived enabling us to test protocols and reagents for the assays that will be performed on the newly collected tissues within the proposed experiments. Also, we will minimize the number of animals needed by first choosing the best available animal model to study the expression of the SDF-1 pathway in health and disease (experiment 1), second, performing validation of the knockout of SDF-1 in the kidneys of the mice after doxycycline treatment (experiment 2), and third, studying the effect of SDF-1

and its receptors in glomerular function also during pathologic condition (experiments 3.1 and 3.2). These three steps are not performed parallel but will be performed step-by-step with a GO/No GO decision after each part.

Refinement

Most importantly to mention is, that we have a cell specific inducible knock-out mice which allows representative cell-specific and disease specific results in a time-dependent manner. Also, this prevents developmental malformations in the kidneys and we will for the first time be able to study this pathway in adult mice because of the fact that a complete knock-out during development of SDF-1 and its receptors results in a lethal phenotype. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. Previous research by our group and others has shown the translational value of this type of studies. For the collection of urine, mice need to be placed in a metabolic cage for 24 hours . Shelters will be placed in the metabolic cages to reduce distress and enhance animal welfare.

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

In order to prevent unnecessary discomfort or stress, the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. In case animals reach a humane end point (described in J) the responsible researcher will be contacted. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually.

Despite the formation of renal injury, no suffering or pain is expected within the time frame of the study, based on previous work and the fact that patients with similar pathology are also not treated with pain relieving medication. Fear could be expected from placement in the metabolic cage. This will be minimized by placing shelters in the metabolic cage. Furthermore, in experiments where mice are monitored over a longer time we will test the urine by dipstick analysis on spot urine (spontaneous flow) instead of placement of the mice in a metabolic cage. Only when proteinuria is detected, mice will be placed in a metabolic cages. No adverse effects on the environment are expected.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

The experiments described in this application follow a sequence and do not run in parallel with important GO-No GO decisions wherever possible. The experiments will be well documented and tissues will be systematically stored in a tissue bank. In this way we and others can use the collected tissues of the injury models in other studies preventing the need for another animal experiment. Furthermore, based on literature study, we know that these experiments have not been performed earlier in other studies.

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.

Minor pain may be expected from the injections, no pain relief will be applied for this.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Injection pain

Blood collection

Metabolic cage

Kidney disease

Gene knock-down (No effects on welfare are expected due to the cell specific and inducible nature of the knock-out mouse models used in this proposal)

Explain why these effects may emerge.

Injection pain: Due to injection of Adriamycin or Thy1.1. antibody, mice may experience an injection pain. Rarely, injection via the tail vein can result in tail necrosis. This is a very rare event, but it has to be mentioned here as one possibility. As we have good experienced and trained biotechnicians who will carry out this procedure, development of a tail necrosis after iv injection is very unlikely.

Blood collection: The blood will be collected via tail cut. Mice may experience discomfort during this procedure.

Metabolic cage: The mice may experience discomfort (i.e. fear) due to being placed in a metabolic cage. To reduce discomfort in the metabolic cage, a shelter will be provided.

Kidney disease: Although the mice will develop glomerulosclerosis, this is unlikely to compromise their welfare within the time frame of this study, based on previous work and data of patients with the same pathology.

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

The animal procedures will only be performed by experienced researchers or biotechnicians (i.e. injection or blood collection). Researchers will be trained prior to perform the animal procedures by experienced biotechnicians. Furthermore, social housing will be performed wherever possible to prevent the occurrence of stress and discomfort. Although mice could experience discomfort or stress by being placed in individual metabolic cages. To reduce this, shelters will be placed on the metabolic cages.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The general humane endpoints apply:

1. The animal experiences discomfort as a result of conditions not related to the experiment (e.g. injuries/wounds/infections)
2. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the DEC.
3. (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment

Experiment-related humane endpoints apply:

1. Kidney failure or severe decrease of kidney function due to induction of glomerulosclerosis. This endpoint will apply if the mice become edemic, behave ill, are not motile and/or are sitting apathetic in the cage.

Indicate the likely incidence.

The induction of glomerulosclerosis can lead to a reduced kidney function. In this case mice will become edemic. In regard to the disease models mentioned in this proposal we have observed this only in a few cases (less than 5%). Furthermore, a knock-out phenotype could rarely lead to specific unexpected defects which may indicate a humane endpoint but this is very unlikely as it was until now not observed in these mice.

K. Classification of severity of procedures

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

Based on the individual procedures listed below, we anticipate a cumulative level of discomfort that is mild for all mice. 0% of the animals will develop a moderate or severe level of discomfort.

- Tail vein injection: mild
- Housing in metabolic cage: mild
- Blood collection (baseline): mild
- Doxycycline ip.: mild
- Sacrificing: mild

Experiment	Exp. 1			Exp. 2		Exp. 3.1		Exp. 3.2	
Group	Ctr	Thy1.1.	Adriamycin	Ctr	Knock-out	Ctr	Knock-out	Disease-ctr	Disease-knock-out
Nr. animals	14	28	42	10	25	24	24	120	300
Tail vein injection	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes
Metabolic cage	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Blood collection	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

It is necessary to kill the animals at the end of the experiment to collect tissue needed for analysis and for data collection. Importantly, we need the kidneys of the mice and also we have to collect blood from the mice. Therefore, to avoid suffering from more animal procedures it is necessary to kill the animals at the end of the experiment.

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

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

Yes

Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure SDF-1 signalling in tubular injury and regeneration

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 aims of this procedure are to determine the expression profile of SDF-1 and its receptors in mouse models of tubular injury (aim 1) and to investigate the role of SDF-1 signalling in tubular disease (aim 2). These aims belong to Key objectives 1,3 and 4 described in the project proposal.

Aim 1) The expression profile of SDF-1 and its receptors in experimental acute tubular injury

First of all, we will analyse the expression of SDF-1, CXCR4 and CXCR7 in models for acute kidney injury (AKI): e.g. ischemia reperfusion (I/R) model and glycerol-induced AKI model. The I/R model is a model of hypoxic tubular injury, caused by kidney hypoperfusion normally observed in ischemia and/or kidney transplantation and can be induced by clamping the renal blood supply for approximately 30-40 minutes followed by reperfusion after release of the clamp. The glycerol model is a model of toxic tubular injury, caused by myoglobin, as seen in rhabdomyolysis. The glycerol model is induced by injection of glycerol in the hind legs of the mice inducing rhabdomyolysis and subsequent proximal tubular cell injury. Previously we have successfully used both models. Both models will be performed in SDF-1-DsRed reporter mice and also wildtype mice as outlined in experiment 1, which will allow sensitive analysis of expression of SDF-1 and its receptors in time and in location. As SDF-1 is not easy to detect in tissue using commercially available antibodies, a SDF-1-DsRed reporter mouse will be used to validate the expression of SDF-1 and enable us to study the cellular source of SDF-1 in health and disease. Only heterozygous mice will be bred as complete knock-out of SDF-1 during development results in a lethal phenotype. These heterozygous mice have no reported phenotype or signs of discomfort (own and reported observations). CXCR4 and CXCR7 can easily be stained in mouse tissue using commercially available antibodies. Therefore, the experiments which are performed for detection of the expression of CXCR4 and CXCR7 are performed in wild type animals, which also reduces the amount of animals needed as the expression of both receptors can be detected in one tissue.

In addition to histological analysis of the kidney, the expression of SDF-1, CXCR4 and CXCR7 will be assessed at mRNA level (real-time PCR) and at protein level (immunohistochemistry and Western blot). For both models mice will be sacrificed at different time points (e.g. at day 1, 5, 7 and 14) after induction of the injury, and kidneys, plasma and urine will be collected. Based on the findings of these studies, we will select one of the two AKI models (I/R- or glycerol-induced) to use in the following aims. We will choose the model that induces the largest differences in SDF-1, CXCR4 and CXCR7 expression compared to the healthy controls.

Aim 2) The role of SDF-1 signalling in tubular injury.

2.1. First of all, we will validate the efficiency of the SDF-1 knock-out mouse using immunohistochemistry and methods for RNA and protein detection. Only if the expression of SDF-1 is reduced significantly within the glomeruli of the kidneys the mice will be suitable for further studies **(GO/NO GO Decision)**.

2.2. To study the role of SDF-1 in the development of tubular injury, we will use a specific SDF-1 conditional knock-out (KO) mice. In the conditional KO mice tubular injury will be induced by either using I/R model or glycerol model. SDF-1 expression will be inactivated shortly before induction of the disease model. Animals that are wild type for the SDF-1 floxed gene will serve as controls for the experiments. At different time points, the mice will be sacrificed. All animals will be analysed for renal function parameters (proteinuria, albuminuria, serum creatinine levels), and for histological tubular injury as well as endothelial cell function and capillary rarefaction as main outcome parameters. In addition, activation and proliferation of tubular cells and endothelial cell phenotype and proliferation will be examined in the KO mice.

2.3. If significant effects in the tubular specific conditional knock-out are detected, **(GO/No GO decision)**, we will test which receptor pathways mediate the effects of SDF-1 in the development of tubular injury. Therefore, mice in which the tubular cells are deficient for either CXCR4 or CXCR7 will be analysed. These mice are crossbreds of the PAX8-Cre mice and the CXCR4fl/fl or CXCR7fl/fl mice respectively. This will lead to deletion of the CXCR4 or CXCR7 gene in all epithelial cells of the nephron including proximal tubular epithelial cells. First of all, we will validate the efficiency of the SDF-1 knock-out mouse using immunohistochemistry and methods for RNA and protein detection. Only if the expression of SDF-1 is reduced significantly within the tubular epithelial cells of the kidney, the mice will be suitable for further studies **(GO/NO GO Decision)**.

2.4 In these CXCR4 and CXCR7 conditional knock-out mice, tubular injury will be induced using I/R model or glycerol model and the same parameters as described above for the SDF-1 conditional KO mice will be examined (see Aim 2.2).

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

Experiment 1. Determination of the expression of SDF-1 and its receptors in models of tubular injury (project proposal, key objective 1).

One main complication which is frequently present in patients with acute or chronic kidney injury is the presence of acute tubular injury. There are different models available to induce tubular injury in mice. We will test the glycerol model and the I/R model to induce tubular injury and we will determine the expression profile of SDF-1 and its receptors in the different models and compare them to the healthy situation and to the expression

of this pathway observed in human biopsies of patients with AKI. To validate the expression of SDF-1 and make sensitive analysis of the expression levels observed in experimental renal disease, we will use SDF-1-DSRed reporter mice. To study the expression of the CXCR4 and CXCR7 receptor, no reporter mice will be used.

a) Glycerol model

For the glycerol model, mice will be treated with one intramuscular injection of glycerol (7,5 mg/kg 50% glycerol) into the hind limbs. The glycerol model is a model of toxic tubular injury, caused by myoglobin, as seen in rhabdomyolysis. The glycerol model is induced by injection of glycerol in the hind legs of the mice inducing rhabdomyolysis and subsequent proximal tubular cell injury. As already described in Animal procedure 1 for the Adriamycin model, baseline blood will be collected via tail cut and mice will be placed in a metabolic cage for max. 24h to collect baseline urine. After this, mice are allowed to recover for at least 2 days, before induction of the glycerol model. During the experiment, urine is collected one day before the mice will be sacrificed. At the end of the experiment, mice will be sacrificed for blood and tissue collection. It is known that glycerol injection results in acute direct kidney injury with a maximum elevation of BUN and serum creatinine levels after 24 hours which remains elevated for 5 days and normalizes thereafter. Because of this, mice will be sacrificed at a maximum of 5 different time points (e.g. at day 1, 3, 5, 7 and 14) to look at the expression of SDF-1 and its receptors in a time- and disease-stage-dependent manner.

b) I/R model

For the I/R model, unilateral kidney ischemia reperfusion will be induced by clamping left renal pedicles for 30-40 minutes under anaesthesia (e.g. 2% isoflurane). This is followed by reperfusion of the kidney. Mice will be sacrificed at a maximum of 5 different time points (for example day 1, 3, 5, 7 and 14) after the I/R procedure and tissue samples will be collected and analysed.

This experiment will enable us to evaluate the expression of SDF-1 and CXCR4, as well as CXCR7 in the healthy kidney and during experimental renal disease (aim 1).

Experiment 2. Characterization of the PAX8-SDF-1-flox mouse (project proposal, key objective 3).

2.1 Before we can study the effect of the specific SDF-1 knockout on kidney function and injury, we need to validate the knockout of SDF-1 in the kidneys of the mice after doxycycline treatment. For this, 6 week old mice will receive doxycycline. We have several years of experience with doxycycline inducible models and know that supplementation of doxycycline to the drinking water is sufficient to induce recombination in these models. After doxycycline treatment there will be a wash-out phase of seven days. This period is needed to minimize systemic concentrations of

doxycycline. Two weeks after the doxycycline treatment the mice will be sacrificed and tissues will be collected. The efficiency of the KO will be analysed by immunostaining for SDF-1 on kidney sections and mRNA as well as protein analysis on isolated tubular cells from the kidney.

This experiment will enable us to evaluate the efficiency of the SDF-1 knock-out mice (aim 2.1). Of note, only if the expression of SDF-1 is reduced significantly within the tubuli of the kidneys the mice will be suitable for further studies **(GO/NO GO Decision)**.

2.2 The same procedures will also be performed with CXCR4 and CXCR7 flox mice. This experiment will enable us to evaluate the efficiency of the CXCR4 and CXCR7 knock-out mice (aim 2.3). Of note, only if the expression of CXCR4 and CXCR7 is reduced with at least 90% within the proximal tubular cells, the mice will be suitable for further studies **(GO/NO GO Decision)**.

Experiment 3. The role of SDF-1 signalling in tubular pathology, regeneration and microvascular integrity (project proposal, key objective 3 and 4).

If the conditional KO mouse is suitable for the proposed studies, we will treat 6 week old mice with doxycycline. These mice will receive doxycycline via drinking water for 7 days followed by a wash out phase of another 7 days. Wild type mice of the SDF-1 flox gene will serve as a control.

After this, disease induction will be performed for either the I/R model or the glycerol model. Tissue will be collected and analysed for the expression of the SDF-1 axis using histological methods and methods for the quantification of RNA and protein levels. The severity of injury will also be determined using specific injury markers such as vimentin or KIM-1.

Furthermore, to examine the integrity of the endothelial cells, including their glycocalyx, analysis will be performed at the ultrastructural level using electron microscopy (EM). The number of proliferating (Ki-67 staining) and apoptotic endothelial cells (TUNEL assay and Caspase-3 staining) will be quantified as well. In addition, the number of peritubular capillaries in CD31/CD34 double-immunostained kidney sections will be determined. This experiment will help us to evaluate the role of SDF-1 during proximal tubular injury and regeneration (aim 2.2). If significant effects in this model have been observed, the same procedures will be performed with CXCR4 and CXCR7 conditional KO mice **(GO/NO GO Decision)**. This will help us to determine which receptor pathway is responsible for the observed effects (aim 2.4)

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

The minimal number of animals needed to reach statistical significance within the experiments was determined by power calculations for each experiment. The variation coefficient and effect size were based on data from literature and from previous experiments. For the final design of the experiments a biostatistician will be consulted.

B. The animals

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

Species: SDF-1tm2.1Sjm/J mice (SDF-1/DSRed) and PAX8-rtTA mice will be used to determine the expression profile of SDF-1 and its receptors in health and disease. Furthermore, SDF-1fl/fl mice will be crossed with the PAX8-CRE mice. Also crossbreds of the PAX8-Cre mice and the CXCR4fl/fl or CXCR7fl/fl mice respectively will be used.

Both male and female mice will be used, since we do not expect gender differences in the pathology of the renal disease.

Note: the estimated number of animals only includes the animals needed to perform experiments, not for breeding. The wildtype mice needed to generate the F1 offspring are not included, since they will only be used for breeding.

We will use a mouse model as laboratory animal to study the role of SDF-1 and its receptors in kidney disease, because of its similarity to humans regarding kidney development, cellular organisation in different kidney segments, as well as function, such as filtration of proteins by the glomerulus and subsequent reabsorption by the proximal tubules. We will use wildtype mice and various genetically modified strains. Studying the effect of SDF-1 and its receptors in the complex pathophysiological conditions of glomerulosclerosis is not possible in 'lower' species to be considered as sufficiently comparable to the human situation. Therefore, even though not every pathological aspect in mice appears to be directly translatable to the human situation, it is still the best model available. The various genetically modified organisms are needed to study the specific effects of SDF-1 and its receptors in tubular injury and regeneration.

Origin: SDF-1/DSRed mice were ordered from The Jackson Laboratory. All other mice were derived from Prof. Dr. M.J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Germany. All mice are bred at the Radboudumc Animal facility in Nijmegen and Overasselt.

Estimated number:

To determine the expression profile of SDF-1 and its receptors in tubular disease we will induce two different models of tubular injury (experiment 1) in SDF-1-DSRed mice and in wild-type mice. The group size was calculated and we will use N=6 mice. The final sample size per group should be adjusted for expected attrition, resulting in N=7 mice per group for a maximum of 5 time points. This experiment will be performed for the glycerol model, for which we need also a control group of N=7 mice and the I/R model in which no control group is needed, as reperfusion injury is induced unilaterally. This results in a total amount of N=154 mice for experiment 1.

To test the efficiency of the inducible knock-out as mentioned in experiment 2, a group of N=4 for the different knock-out mice (KO for SDF-1, CXCR4 and/or CXCR7) as well as the wild type is needed for comparison. The final sample size per group should be adjusted for expected attrition, resulting in N=5 mice per group for a maximum of 5 groups, which gives a final sample size of N=25 mice for experiment 2.

In experiment 3, we will establish the effects of the SDF-1, CXCR4 or CXCR7 knockout in a model of experimental tubular injury. Power calculation of this comparison resulted in a N=14 for each group. The final sample size per group should be adjusted for expected attrition which gives a final sample size of N=16 mice per group. We will use a maximum of four different time points as well as knock-out mice for SDF-1, CXCR4, CXCR7 and a combination of both receptors and compare the pathologic situation with the pathologic knock-out situation. This gives a final sample size of N=320.

In summary, the maximum number of animals which will be used is N=499 mice. Depending on the GO/NO GO Decision, lower numbers may be expected.

Life stages: Our experiments will preferably be performed in mice younger than 3 months. Mice will not be allowed to grow older than one year.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
SDF-1-DSRed	The Jackson Laboratory	77	6-10 weeks
PAX8-rtTA/CRE-SDF-1fl/fl	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	69	6-10 weeks
PAX8-rtTA-CRE-CXCR4fl/fl	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	69	6-10 weeks
PAX8-rtTA/CRE-CXCR7fl/fl	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	69	6-10 weeks

PAX8-rtTA/CRE-CXCR4fl/fl- CXCR7fl/fl	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	69	6-10 weeks
PAX8-rtTA/CRE	Prof. Dr. M. J. Moeller, Department of Nephrology and Clinical Immunology, RWTH University Hospital Aachen, Aachen, Germany	69	6-10 weeks
SV129	Charles River	77	6-10 weeks

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

A significant part of our research is performed with in vitro cultures using cell-lines. To evaluate the role of SDF-1, we will functionally test the effect of SDF-1 stimulation as well as inhibition on cultured proximal tubule cells under physiological and pathophysiological (toxic and hypoxic) conditions. Different assays to determine cell viability, metabolic activity, cell proliferation and migration will be used. This will provide us with information which

can be used for the preparation of the animal experiments. Furthermore, the effects seen in vitro can be compared with the in vivo data. Therefore, we will first test the effects of pathway stimulation and inhibition in vitro to avoid unnecessary animal experiments and to determine which effect on cell injury or regeneration can be observed after SDF-1 pathway inhibition/stimulation. However, we need a whole organism to be able to study and differentiate between the effects of SDF-1 and its receptors on kidney injury. Also the consequences of inhibition of this axis cannot be mimicked in vitro. The mouse is known to resemble renal injury observed in humans and has an adequate size to study the kidney extensively.

Reduction

Prior to each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. Furthermore, phenotype analysis in mice is only applied when genotype analysis confirms mutations in the targeted gene. Also, we strive to make optimal use of the material from each mouse by combining experiments wherever possible.

We will try to minimize the number of animals needed by first choosing the best available animal model to study the expression of the SDF-1 pathway in health and disease (experiment 1), second, performing validation of the knockout of SDF-1 in the kidneys of the mice after doxycycline treatment (experiment 2), and third, studying the effect of SDF-1 in tubular injury (experiment 3). These four steps are not performed parallel but will be performed step-by-step with a GO/No GO decision after each part.

For the I/R reperfusion model we have chosen to perform the ischemia unilaterally. In this way we have an affected and an control kidney from the same animal. By performing I/R unilaterally we do not need Sham operated control mice.

Refinement

Most importantly to mention is, that we will use cell specific inducible knock-out mice. This will allow representative cell-specific and disease specific results in a time-dependent manner. Also, this prevents developmental malformations in the kidneys and we will for the first time be able to study this pathway in adult mice because of the fact that a complete knock-out during development of SDF-1 and its receptors results in a lethal phenotype.

To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. Previous research by our group and others has shown the translational value of this type of studies. For the collection of urine, mice need to be placed in a metabolic cage. Shelters will be placed in the metabolic cages to reduce distress and enhance animal welfare.

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

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. In case animals reach a humane end point (described in J) the responsible researcher will be contacted. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. If necessary, anaesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort.

Despite the formation of renal injury, no suffering or pain is expected within the time frame of the study, based on previous work and the fact that patients with similar pathology are also not treated with pain relieving medication. Pain could be expected from the animal procedures (e.g. operation of the mice for I/R or injection of glycerol) which could make it necessary to treat animals with pain relieving medication. This will be decided individually. Fear could be expected from placement in the metabolic cage. This will be minimized by placing shelters in the metabolic cage. No adverse effects on the environment are expected.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

The experiments described in this application follow a sequence and do not run in parallel with important GO-No GO decisions wherever possible. The experiments will be well documented and tissues will be systematically stored in a tissue bank. In this way we and others can use the collected tissues of the injury models in other studies preventing the need for another animal experiment. Furthermore, based on literature study, we know that these experiments have not been performed earlier by other groups.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Minor pain may be expected from the injections, no pain relief will be applied for this. After surgical procedures such as the I/R-model in which unilateral kidney ischemia reperfusion is performed, analgesia will be used to reduce discomfort and pain.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Necrosis because of injection of glycerol into the hind limbs (Glycerol model), injection pain, metabolic cage, blood collection

Anxiety, stress and discomfort due to anaesthesia

Surgical procedure / Wound healing (I/R model)

Although the mice will develop tubular injury, this is unlikely to compromise their welfare within the time frame of this study, based on previous work and data of patients with the same pathology.

Explain why these effects may emerge.

The mice may experience discomfort (i.e. fear) due to being placed in a metabolic cage. To reduce discomfort in the metabolic cage, a shelter will be provided.

Necrosis can occur because of injection of glycerol into the hind limbs (Glycerol model)

Blood collection: The blood will be collected via tail cut. Mice may experience discomfort during this procedure.

Wound healing can lead to some discomfort for the mice as it can occur after surgical procedures.

Although the mice will develop tubular injury, this is unlikely to compromise their welfare within the time frame of this study, based on previous work and data of patients with the same pathology.

Gene knock-down (No effects on welfare are expected due to the cell specific and inducible nature of the knock-out mouse models used in this proposal)

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

The animal procedures will only be performed by experienced researchers or biotechnicians (i.e. injection or blood collection, surgical procedures). Researchers will be trained prior to perform the animal procedures by experienced biotechnicians. Furthermore, social housing will be performed wherever possible to prevent the occurrence of stress and discomfort. Although mice could experience discomfort or stress by being placed in individual metabolic cages. To reduce this, shelters will be placed in the metabolic cages. Analgesics will be given to mice after surgical procedure to reduce discomfort from wound healing.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The general humane endpoints apply:

1. The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment (e.g. injuries/wounds/infections)
2. The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighted by the DEC
3. (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment

Experiment-related humane endpoints apply:

1. Wound infection after unilateral kidney ischemia reperfusion.
2. Kidney failure or severe decrease of kidney function due to glycerol injection. This endpoint will apply if the mice behave ill, are not motile and/or are sitting apathetic in the cage.
3. Severe necrose of muscle after glycerol injection. This endpoint will apply if necrosis becomes a visible lesion.

Indicate the likely incidence.

A knock-out phenotype could rarely lead to specific unexpected defects which may indicate a humane endpoint but this is very unlikely as it was until now not observed in these mice. The animal procedures can lead to experiment-related endpoints. These include wound infection after unilateral kidney ischemia reperfusion injury as well as severe necrosis after glycerol injection and a severe decrease of the kidney function which can happen due to overreaction against the injected glycerol. In our experience both wound inflammation and necrosis after glycerol injection are both very rare observation happening in less than 1% of the mice.

K. Classification of severity of procedures

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

Based on the individual procedures listed below, we anticipate a cumulative level of discomfort that is mild for doxycycline treated non-injected mice (5%), mice injected with vehicle (3%) and moderate for mice that are either injected with glycerol or in which the ischemia/reperfusion model is induced (92%).

-Injection vehicle: mild

-Anaesthesia: moderate

-Injection of glycerol: moderate

-Ischemia/reperfusion: moderate

-Housing in metabolic cage: mild

-Blood collection (baseline): mild

- Sacrificing: mild

Experiment	1			2	
Group	Ctr	Glycerol	I/R	Ctr	Knock-outs
Nr. animals	14	70	70	5	20
Injection vehicle	Yes	No	No	No	No
Anaesthesia	No	No	Yes	No	No
Injection of glycerol	No	Yes	No	No	No
Unilateral ischemia reperfusion	No	No	Yes	No	No
Housing in metabolic cage	Yes	Yes	Yes	No	No

Experiment	3	
Group	Disease model wild-type	Disease model Knock-out
Nr. animals	64	256
Injection vehicle	No	No
Anaesthesia	No	No
Injection of glycerol	Yes	Yes
Unilateral ischemia reperfusion	No	No
Housing in metabolic cage	Yes	Yes

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

It is necessary to kill the animals at the end of the experiment to collect tissue needed for analysis and for data collection. Importantly, we need the kidneys of the mice and also we have to collect blood from the mice. Therefore, to avoid suffering from more animal procedures it is necessary to kill the animals at the end of the experiment.

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

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

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0029
2. Titel van het project: Resolving the cell-specific actions of Stromal Derived Factor 1 in kidney injury and regeneration
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar nieuwe aanknopingspunten voor de ontwikkeling van behandelingen die nierschade kunnen beperken of genezen
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC:22-02-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 07-03-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 13-3-2017 tot 11-04-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 11-04-2017
 - advies aan CCD: 08-05-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 13-03-2017
 - Datum antwoorden: 11-04-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-2.1: De commissie is van mening dat dit geen translationeel maar uitsluitend basaal onderzoek betreft.

Antwoord: Het project is nu gecategoriseerd als "basic research"

-3.1: De eerste zin is te algemeen gesteld en kan beter weggelaten worden.

Antwoord: Zoals aanbevolen hebben we de eerste zin verwijderd

-3.2: In het project is sprake van (genummerde) aims, key objectives en key questions. De onderzoekers worden verzocht na te gaan of de verwijzingen naar de key questions en key objectives in alle onderdelen (inclusief figuren) van het project eenduidig, volledig en consequent is.

Antwoord: We zijn dit nagegaan en de verwijzingen zijn consequent doorgevoerd.

-3.2: Deze aanvraag spitst zich toe op SDF-1. In het geformuleerde hoofddoel van de aanvraag komt dit onvoldoende tot uiting.

Antwoord: Om SDF-1 signaling meer in het hoofddoel te benadrukken hebben we de volgende zin aan het doel toegevoegd.

"In this proposal we will study the importance of SDF-1 signaling in the processes of kidney disease and repair."

-3.3: Zijn er 1 miljoen patiënten die lijden aan nierschade? De onderzoekers worden verzocht dit iets genuanceerder te presenteren.

Antwoord: We hebben deze zin veranderd en met nieuwe waarden die door de Nierstichting bekend zijn gemaakt aangevuld. De volgende zin is aan sectie 3.3. Relevance toegevoegd.

"In the Netherlands, 10% of the Dutch population has chronic kidney injury (1.7 million people). However, 40% of them (680,000 people) are not aware of this injury as complaints often only arise when the renal function has declined to 30%. People with chronic kidney injury have an increased risk of kidney failure, and death from cardiovascular disease."

-3.4.2: Key questions 6 en 7 worden in de tekst van key objective 4 genoemd zonder uitleg wat hiermee wordt bedoeld. De onderzoekers worden verzocht dit te verhelderen.

Antwoord: De verwijzingen naar de Key questions zijn uit de tekst verwijderd.

-3.4.2: Uit de DAP blijkt dat om praktische redenen het adriamycine model gebruikt zal worden. Dit lijkt in tegenspraak met de bewering dat het beste model (adriamycine of Thy 1.1) gekozen zal worden om deze experimenten mee uit te voeren.

Antwoord: We hebben de voorkeur voor het adriamycine model uit de aanvraag verwijderd en zullen werken met het model wat het beste werkt voor het onderzoek naar SDF-1 in glomerulosclerose.

Description of Animal Procedures:

*DAP1

-A1: aim 2, onderdeel 2.2: de vraagstelling van dit onderzoek is ziektegerelateerd. Waarom wordt de rol van SDF-1 signalling in de ontwikkeling van glomeruli en hun normale functie onderzocht? Wat is de plaats van aim 2 in de strategie van de projectaanvraag?

Antwoord: In dit project wordt zoals in de research strategie de rol van SDF-1 onderzocht in zowel the normale fysiologie en pathofysiologie van de nier. Om te kunnen begrijpen hoe SDF-1 betrokken is bij het ziektebeeld moeten we ook begrijpen of en hoe SDF-1 betrokken is bij de normale fysiologie van de nier. Zeker als we uiteindelijk (buiten de scope van deze aanvraag) dieren willen behandelen met remmers voor SDF-1. Toekomstige behandeling zal enkel gedaan worden in volledig ontwikkelde nieren. Daarom hebben we het experiment waarin we de rol van SDF-1 in de ontwikkeling van de nier willen onderzoeken uit de aanvraag verwijderd.

-J: Zijn er geen proefspecifieke humane eindpunten? Waardoor ontstaat de necrose aan de staart? Kan deze necrose niet vermeden worden door bijvoorbeeld een andere injectieroute te kiezen of hogere eisen te stellen aan de skills van de injecteur?

Antwoord: We hebben het volgende proefspecifieke eindpunt toegevoegd:

1. Kidney failure or severe decrease of kidney function due to induction of glomerulosclerosis. This endpoint will apply if the mice become edemic, behave ill, are not motile and/or are sitting apathetic in the cage."

Wat betreft de necrose aan de staart geven we al aan dat we door de expertise van de biotechnisch personeel van het CDL geen problemen bij de injecties verwachten.

-J3: De eerste zin is niet begrijpelijk voor de commissie. Er worden in dit project toch geen dieren gedood zonder voorafgaande handelingen?

Antwoord: We hebben de zin veranderd. Er staat nu het volgende:

"The induction of glomerulosclerosis can lead to a reduced kidney function. In this case mice will become edemic. In regard to the disease models mentioned in this proposal we have observed this only in a few cases (less than 5%). Furthermore, a knock-out phenotype could rarely lead to specific unexpected defects which may indicate a humane endpoint but this is very unlikely as it was until now not observed in these mice."

*DAP2

-A1: In de dikgedrukte zin in de inleiding ontbreekt aim 2.

Antwoord: Aim 2 is aan de zin toegevoegd.

-J: De verwachte incidentie van de ernstige necrose en overreactie na glycerol injectie is niet met een percentage aangegeven.

Antwoord: Dit hebben we veranderd. De incidentie wordt nu als volgt beschreven:

"The animal procedures can lead to experiment-related endpoints. These include wound infection after unilateral kidney ischemia reperfusion injury as well as severe necrosis after glycerol injection and a severe decrease of the kidney function which can happen due to overreaction against the injected glycerol. In our experience, both wound inflammation and necrosis after glycerol injection are both very rare observations happening in less than 1% of the mice."

-K: Doden zonder voorafgaande handelingen is licht ongerief. Is er geen ongerief voor de dieren (4%) die alleen doxycycline via het drinkwater krijgen?

Antwoord: Dit is aangepast

-De onderzoekers worden verzocht na te gaan of de vragen en opmerkingen over één van beide DAPs ook van toepassing zijn op de andere DAP.

Antwoord: Dit hebben we gedaan

Niet-technische samenvatting:

-3.5: De commissie adviseert om het woord 'licht' in plaats van 'mild' te gebruiken.

Antwoord: We hebben 'mild' vervangen voor 'licht'.

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Door de aanpassingen die gemaakt zijn in de aanvraag is het totaal aantal dieren veranderd (nu 1086 ipv 1116 muizen) . Dit is in de DAP beschrijving en NTS aangepast.

- 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. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4B uit de handreiking 'Wat is een project'. De verschillende subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, duidelijk beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. 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. In dit project wordt één gen bestudeerd in glomeruli en tubuli van de nier, waardoor de samenhang evident is. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is bij muismodellen het belang van SDF-1 signaling in de processen van nierziekte en herstel te bepalen. Het uiteindelijke doel is om een therapie te ontwikkelen waarmee nierschade kan worden beperkt of gerepareerd bij patiënten met een nierziekte. De onderzoekers focussen op het effect van SDF-1 en de beide receptoren voor dit chemokine: CXCR4 en CXCR7. Hiervoor worden state of the art induceerbare celspecifieke knockout muizenlijnen gebruikt waardoor de bijdrage van de verschillende componenten tijdens beschadiging van zowel glomeruli als tubuli apart onderzocht kan worden. Indien een nieuwe farmaceutische aanpak voor herstel of vermindering van nierschade wordt gevonden, dan zal de

klinische toepasbaarheid daarvan in vervolgonderzoek worden bepaald. Er is binnen dit project nog geen directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project daaraan zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de bijdrage van de SDF1/CXCR4/CXCR7 as aan pathofysiologische processen bij nierziekten op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden van progressieve nierziekten en dat daar behoefte aan is. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor patiënten is dit onderzoek indirect van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. Meer kennis over SDF-1signalering bij nierziekte en herstel kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe behandelmogelijkheden voor progressieve nierziekten. Nieuwe behandelingen kunnen er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige ziekten, zoals chronische (progressieve) nierziekten, is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de bewering van de aanvrager dat er geen nadelige effecten voor het milieu te verwachten zijn, in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor 42 % van de dieren wordt matig ongerief verwacht vanwege een operatie of door het inspuiten van glycerol in een pootspier. Voor de overige dieren (58%) wordt licht ongerief verwacht.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door genetische modificatie. Bij de meeste dieren worden deze modificaties alleen actief na toediening van een bepaalde stof en uitsluitend in bepaalde niercellen. Naar de mening van de DEC wordt de integriteit van de dieren daardoor niet noemenswaardig aangetast.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met de gebruikte muismodellen en procedures ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De aanvragers zullen de rol van SDF-1 in normale en pathologische omstandigheden eerst *in vitro* bestuderen bij gekweekte niercellen. De informatie hieruit zal gebruikt worden bij het design van de *in vivo* experimenten. Een nier is een complex orgaan dat uit meerdere celtypen bestaat en in samenhang met andere organen en de bloedsomloop functioneert. Nierziekten en het beloop daarvan kunnen dan ook niet goed met proefdiervrije alternatieven onderzocht worden. Een aantal onderdelen van het project zal dus *in vitro* bestudeerd kunnen worden. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolggewijze experimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. Waar mogelijk worden

experimenten gecombineerd om optimaal gebruik te kunnen maken van het materiaal.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Muizen zijn de minst complexe diersoort waarin de ontwikkeling en functie van de nieren voldoende overeenkomt met de menselijke nier, en waarvoor onderzoeksmethoden beschikbaar zijn om dit onderzoek uit te kunnen voeren. Het gebruik van metabole kooien wordt zoveel mogelijk beperkt. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen ingezet worden.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun geestelijke gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Chronische nierziekte (CKD) komt vaak voor: 10% van de Nederlanders heeft CKD, waardoor zij een grotere kans hebben op nierfalen en sterfte door cardiovasculaire ziekte. Ernstig nierfalen kan alleen behandeld worden met niervervangende therapie. Meer kennis van de processen die zich afspelen tijdens chronische progressieve nierziekte kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën om het degeneratieve proces te stoppen en herstel te bevorderen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het vergaren van meer kennis over de processen die zich afspelen tijdens CKD van substantieel belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: bij muismodellen het belang van SDF-1 signalering in de processen van nierziekte en herstel te bepalen. Het uiteindelijke doel is om een

therapie te ontwikkelen waarmee nierschade kan worden beperkt of gerepareerd bij patiënten met een nierziekte. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen



Centrale Commissie Dierproeven

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171674

Bijlagen

2

Datum 8 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 mei 2017. Het gaat om uw project "Resolving the cell-specific actions of SDF-1 in kidney injury and regeneration". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020171674. 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:

8 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171674

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
8 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171674

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postbus: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED]
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Universitair docent/Onderzoeker
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Datum:
8 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171674

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantievoor Dierenwelzijn
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 augustus 2017
Geplande einddatum: 1 augustus 2022
Titel project: Resolving the cell-specific actions of SDF-1 in kidney injury and regeneration
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar nieuwe aanknopingspunten voor de ontwikkeling van behandelingen etc
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]


Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
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: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 8 mei 2017

Datum:
8 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171674



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Grooteplein 29
Postbus 9101, HP 231, route 231 (CDL)
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171674

Bijlagen

2

Datum 8 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 8 mei 2017

Vervaldatum: 7 juni 2017

Factuurnummer: 171674

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220 CDL

projectnummer: 2016-0029 Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020171674	€ 1.287,00

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.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 31 mei 2017 9:55
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD1030020171674
Bijlagen: AVD1030020171674-nieuweNTS_RUDEC2016-0029.pdf
Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Antwoord op uw e-mail van 23 mei 2017 (zie onderstaand), hierbij verstuurd door de IvD van Radboudumc/RU namens de onderzoeker [REDACTED].

Als bijlage de aangepaste NTS. Indien het nodig dat we deze uploaden via de beschermde NetFTP-verbinding dan zullen we dat ook doen (laat u dat weten svp?).

mvg, [REDACTED]

Nijmegen, 31 mei 2017

Geachte mevrouw [REDACTED]

We hebben de niet technische samenvatting van het project, "Resolving the cell-specific actions of SDF-1 in kidney injury and regeneration" met aanvraag nummer AVD1030020171674, zoals voorgesteld aangepast. De beschrijving van de handeling 'uit de proef genomen worden' is nu vervangen door 'worden gedood'.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

The Netherlands
www.radboudumc.nl

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 23 mei 2017 14:56
Aan: [REDACTED]
CC: Postbus instantie voor dierenwelzijn
Onderwerp: vraag bij de behandeling van AVD1030020171674

Geachte [REDACTED],

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Bij de behandeling hiervan zouden wij u willen verzoeken een aanpassing in de Niet technische samenvatting te doen. Het betreft uw project 'Resolving the cell-specific actions of SDF-1 in kidney injury and regeneration' met aanvraag nummer AVD1030020171674.

U beschrijft in de NTS onder punt 4.4 dat de dieren bij het bereiken van de Humane Eindpunten ‘uit de proef genomen worden’. De CCD hecht aan een transparante communicatie richting het publiek, en als zodanig is de NTS ook bedoeld, en ziet dit als verhullend taalgebruik. Wij willen u dan ook verzoeken om deze zin aan te passen naar bijvoorbeeld: ‘bij het bereiken van de Humane eindpunten worden de dieren gedood’

Uw aanvraag zal in de vergadering van 2 juni door de CCD besproken worden,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Namens **Centrale Commissie Dierproeven**

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....

T: 0900 2800028

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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101,

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1030020171674

Bijlagen

1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 8 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Resolving the cell-specific actions of SDF-1 in kidney injury and regeneration" met aanvraagnummer AVD1030020171674. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 31 mei 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u de Niet Technische samenvatting gewijzigd.

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 "Resolving the cell-specific actions of SDF-1 in kidney injury and regeneration" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een vergunning niet langer kan zijn dan 5 jaar.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 mei 2017. 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 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:
6 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171674

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:


M. G. de Putter
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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

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

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Resolving the cell-specific actions of SDF-1 in kidney injury and regeneration" met aanvraagnummer AVD1030020171674, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair docent/Onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 8 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 mei 2017, ontvangen op 8 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 31 mei 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 SDF-1 signaling in glomerulosclerosis				
	Muizen (Mus musculus) /	587	100% Licht	
3.4.4.2 SDF-1 signalling in tubular injury and regeneration				
	Muizen (Mus musculus) /	499	92% Matig 8% Licht	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:
AVD1030020171674

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:

AVD1030020171674

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 onvereenigbaar 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:
AVD1030020171674

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 W17-11										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20171684	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x			
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x						
5	DEC-advies				x		x			
6	Ontvangstbevestiging				x		x			
7	Adviesnota CCD		x						x	
8	Beschikking en vergunning				x		x			



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

Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	50169181
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg
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.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

4-6

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	[Redacted]
Functie	Hoogleraar	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	0 [Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	[Redacted]
Functie	promovendus	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	0 [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 | IvD Maastricht | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | ivd-secretariaat-cpv@maastrichtuniversity.nl | |
- 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 | 15 - 4 - 2017 |
| Einddatum | 15 - 4 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de rol van calciumfosfaat in botregeneratie
- 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 | secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568 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 ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	Maastricht [Redacted]
Datum	9 - 5 - 2017 [Redacted]
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.

The golden standard for bone reconstruction is an autograft, however, the use of autograft is associated with important drawbacks such as limited availability and side effects of grafting procedure. As a consequence, there is an increasing interest in improved synthetic bone graft substitutes, the biological performance of which is still considered inferior to that of natural grafts (1).

Synthetic bone graft substitutes, often calcium phosphate (CaP)-based ceramics, with chemical composition comparable to that of bone mineral, can be produced in large quantities, against relatively low cost (2,3). While this type of material has been clinically used for decades, only recently a family of such materials has been developed, with well-defined physico-chemical properties that are considered as a comprehensive alternative to natural bone grafts. This is largely due to their intrinsic osteoinductive potential, which was so far believed to be a property characteristic of biologics, such as bone morphogenetic proteins (BMPs). While ample knowledge exists of properties, which are important for a biomaterial to be osteoinductive, the exact biological mechanism has not been described yet (4). One of the reasons is that osteoinductivity of biomaterials is tested using in vitro experiments; such a system does not allow for the in-depth study of biological mechanisms. In the past years, we have established an in vitro system, using culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on different biomaterials, which has a good predictive value for the in vivo response in terms of bone formation(5). However, to understand the exact bone formation mechanism, the calcium phosphate materials need to be implanted in vivo, as bone formation does not take place in vitro. Such a system will undoubtedly provide new insights into pathways eventually leading to new bone formation. This, in turn, can be used for iterative improvements of bone regenerative strategies using synthetics or biologics.

CaP ceramics are suitable for treating small size bone defect, but for generating bone in critical size defects, a common strategy is to combine the ceramics with autologous cells before implantation (1). Newly formed bone is formed through a complex mechanism which is dependent on many biological and physico-chemical elements. The exact role of each of these factors during different stages of bone formation is still not determined. However, the role of some proteins, also known as osteogenic markers, is imperative and essential in these cellular processes. To obtain further insight into the mechanism of bone formation, Here, we attempt to design and test materials that trigger the expression of such proteins and ENPP1. ENPP1, or Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1, is the gene encoding for the protein Plasma Cell Glycoprotein 1 (PC-1), a type II transmembrane glycoprotein that is involved in the regulation of mineralization in several tissues (6). Hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (TCP) are extensively used CaP ceramics in orthopedic applications, however, the two ceramics possess different properties. For example, the biodegradation of TCP is faster than that of HA; the biological performance, in terms of osteoinductivity and osteoconductivity (i.e. ectopic and orthotopic bone formation) is different. HA has been shown a less appropriate candidate for treating critical sized bone defect when compared with TCP. The hypothesis is that the differences in bone regenerative potential between the two ceramics are due to differential expression of proteins, such as ENPP1 by the cells in close vicinity to the materials.

References:

- [1] Yuan H, Fernandes H, Habibovic P, de Boer J, Barradas AMC, de Ruiter A, et al. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:13614–9.
- [2] Shih Y-R V, Hwang Y, Phadke A, Kang H, Hwang NS, Caro EJ, et al. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:990–5.
- [3] Bose S, Fielding G, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends Biotechnol* 2013;31:594–605.
- [4] Habibovic P, Juhl M V, Clyens S, Martinetti R, Dolcini L, Theilgaard N, et al. Comparison of two carbonated apatite ceramics in vivo. *Acta Biomater* 2010;6:2219–26.
- [5] Barradas AMC, Monticone V, Hulsman M, Danoux C, Fernandes H, Tahmasebi Birgani Z, et al. Molecular mechanisms of biomaterial-driven osteogenic differentiation in human mesenchymal stromal cells. *Integr Biol (Camb)* 2013;5:920–31.
- [6] Johnson K. et al. , 2003: Linked deficiencies in extracellular PPI and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression , *J. Bone Miner. Res.* 18:994-1004

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?

In this project, we will test two types of CaP ceramics, with known bone regenerative potential: hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (TCP), without or loaded with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (hMSCs). The materials will be implanted subcutaneously in mice with the final aim to determine the role of Ectonucleotide Pyrophosphatase 1 (ENPP1) in material-induced bone formation.

The aim of the first and second part of the study is to investigate the importance of this differential expression by endogenous murine cells and cultured hMSCs, respectively. To obtain further insight in the mechanism of bone formation, ENPP1 will be suppressed in hMSC's by using shRNA inserted in pLK0.1 and shRNA scramble (control) to isolate the role of this protein in materials-induced bone formation.

3.3 Relevance

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

The aim of regenerative medicine approaches is to stimulate the self-regenerative potential of the body. In this way, regenerative strategies are used to restore damaged or diseased organ or tissue and regain normal function by exploiting the natural regenerative capacity of the body, instead of passively taking over the function by permanent implants. The role of synthetic materials in regenerative strategies has grown tremendously in the past decades, considering an increasing need for readily available and affordable solutions for our ageing populations. Osteoinductive biomaterials we are investigating here are an excellent example of the synthetic biomaterials for regenerative medicine strategies. They are fully synthetic, and therefore not associated with stability issues, and they can be produced in large quantities against relatively low cost, forming an attractive alternative to patient's own tissue. Upon implantation in clinically relevant challenging bone defects, these materials instruct the cells from the surrounding to differentiate towards the osteogenic lineage and form new bone. This has been demonstrated *in vivo*, however, the exact mechanism has not been described yet, despite work of a number of research groups around the world. The unique combination of a family of synthetic biomaterials with already demonstrated osteoinductive potential that no other research group possesses, with the high-end protein analyses and production equipment provides all the relevant ingredients to answer the question of the mechanism behind osteoinduction by biomaterials, and role of individual material properties in this mechanism. In summary, the innovative elements of this proposal lie in a unique combination of, on the one hand, instructive synthetic biomaterials for bone regeneration and access to and experience with hMSCs, and on the other, advanced protein analysis and production techniques.

3.4 Research strategy

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

The overall aim of this project is to unravel biological mechanisms governing osteoinduction by CaP ceramics, to be able to eventually develop new improved bone graft substitutes. To this end, we are working with a family of CaP ceramics with known osteoinductive potential *in vivo*. So far, we have performed extensive studies *in vitro*, based on culture of hMSCs on these materials. Specifically, the following steps will be undertaken:

- 1) HA and TCP (without cells) will be implanted subcutaneously in FVB mice. FVB mouse strain was previously shown to facilitate ectopic bone formation induced by CaP ceramics, in contrast to a range of other strains [1]. This condition is: to monitor protein expression in host-derived cells attracted into the materials when implanted without cells and subsequently evaluate the bone formation.
- 2) CaP's without cells are not able to promote ectopic bone formation in nude mice. While combining these materials with cells or growth factor have shown to initiate bone formation. HA and TCP loaded with hMSC will be implanted subcutaneously in immunodeficient (nude) mice. We have performed an extensive number of experiments culturing hMSCs in vitro on the ceramic materials, the results have shown high ENPP1 expression on TCP compares to HA. This condition is: to monitor the differences between HA and TCP, in terms of protein expression and eventually bone formation capacity [2].
- 3) Based on our in vitro studies ENPP1 expression has shown to be higher on TCP compare to HA. Conducting infection on hMSC while cultured on TCP (knockdown ENPP1) will enable us to stress the differences between the two conditions, more clearly. hMSC infected with shRNA-ENPP1 (treatment group), shRNA-scramble (control group), TCP loaded with hMSC and TCP without cells will be implanted subcutaneously in nude mice to further determine the role of ENPP1 in materials-induced bone formation.

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.

A. Improving CaP physico-chemical properties to induce bone formation (sub-goal 1)

The *in vivo* studies we are requesting approval for will provide the insight regarding the role of the proteins, in particular those that were shown relevant for the *in vitro* osteogenic differentiation, in the process of true bone formation. This information can then be linked to the specific property or set of properties of the CaP ceramics. By doing so, and by understanding the mechanisms of the interactions between cells and the materials, we will be able to design and improve CaPs for treating large bone defect.

To achieve this aim, HA and TCP will be subcutaneously implanted in FVB mice for a maximum of 10 weeks in order to monitor the initiation and the development of bone mineral(3). In addition, HA and TCP, loaded with hMSCs, cultured on the materials for 2 days (*in vitro*) will be implanted in nude mice for a maximum of 10 weeks, The particles, sized 2-3 mm (30 mg), will be inserted into subcutaneous pockets at the back of the mice by creating a a surgical incision, under anesthesia, smaller than 1 cm. Upon explantation, the samples will be evaluated using histology and histomorphometry, to determine the quality and the amount of newly formed bone. Furthermore, qPCR, Western blot and immunohistochemical analyses will be performed to analyse the (spatial) expression of relevant markers of osteogenic differentiation at mRNA and protein levels.

B. Understanding the role of ENPP1 in bone regeneration and entitling it as a reliable osteogenic marker (sub-goal 2&3)

ENPP1 influences bone formation. Based on our *in vitro* results where ENPP1 expression in hMSCs was knocked down and cultured on TCP ceramic, it was observed that this positively affects the expression of BMP2, which is a known osteogenic marker. In the proposed study, the role of ENPP1 will be evaluated in bone regeneration by subcutaneously implanting constructs consisting of TCP and hMSCs with ENPP1 knocked-down in nude mice. For knocking down ENPP1, hMSCs will be infected with viral particles (pLKO.1) produced in 293T cells. The infected cells will be cultured on TCP particles for 2 days *in vitro* then implanted in mice for a maximum of 10 weeks. It is hypothesized that there will be a significant difference in the extent of osteogenic differentiation and ectopic bone formation between the constructs with hMSC-scrambled (control) and hMSC-shRNA (ENPP1). The constructs will be inserted into subcutaneous pockets at the back of the mice by creating a a surgical incision, under anaesthesia, smaller than 1 cm. Upon explantation, the samples will be evaluated using histology and histomorphometry, to determine the quality and the amount of newly formed bone. Furthermore, qPCR, Western blot and immunohistochemical analyses will be performed to analyse the (spatial) expression of

relevant markers of osteogenic differentiation at mRNA and protein levels.

References:

- [1] Barradas AMC, Yuan H, van der Stok J, Le Quang B, Fernandes H, Chaterjea A, et al. The influence of genetic factors on the osteoinductive potential of calcium phosphate ceramics in mice. *Biomaterials* 2012;33:5696–705.
- [2] Muraglia A, Martin I, Cancedda R, Quarto R. A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions. *Bone* 1998;22:131–4.
- [3] Corre P, Merceron C, Vignes C, Sourice S, Masson M, Durand N, et al. Determining a clinically relevant strategy for bone tissue engineering: An “all-in-one” study in nude mice. *PLoS One* 2013;8:1–13.

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.

Conditions A and B are parallel experiments, their outcomes will not affect each other. However, conduction condition C is dependent on the outcome of conditions B; In case of no differences between HA and TCP, in terms of ENPP1 expression and other osteogenic markers, condition C will not be executed. To coherence between the two parts (A and B described above) of the study is that in both cases, we will investigate the process of ectopic bone formation, which is the ultimate *in vivo* proof of osteoinduction by CaP ceramics. In both cases the interest is in determining the molecular mechanisms behind the process of osteoinduction by determining the expression of markers of osteogenic differentiation, including ENPP1, which we have earlier selected as potential predictive marker of osteoinduction by biomaterials. The difference between the two studies lies in the fact that in the first study, we study the process of bone formation by the endogenous mouse cells and by implanted hMSCs, focusing on the extent of new bone formation and the expression of osteogenic markers including ENPP1, whereas in the second study, we zoom in on this marker to better understand the mechanism behind osteoinduction by biomaterials.

The milestones of the first study are:

- Confirming the difference in osteoinductive capacity between HA and TCP by demonstrating the difference in incidence and the amount of newly formed bone both induced by the materials alone in FVB mice and by materials loaded with hMSCs in nude mice;
- Demonstrating that the difference in osteoinductive capacity is due to differences in the expression of markers of osteogenesis, including BMP2, OP, OC;
- Demonstrating that ENPP1 is solely or in higher amounts expressed on TCP as compared to HA;
- Demonstrating that the expression of ENPP1 on TCP is limited to the surface of the material, i.e. locations where bone formation is initiated.

The milestones of the second study are:

- Confirming that ectopic bone formation in nude mice occurs upon implantation of TCP particles loaded with untreated hMSCs, in contrast to the control without the cells;
- Demonstrating the difference in osteoinductive capacity in terms of incidence and the amount of bone formation between TCP loaded with hMSC treated with shRNA-scramble (control) and with hMSCs treated with shRNA-ENPP1.
- Demonstrating that the difference in osteoinductive capacity between TCP loaded with hMSC treated with shRNA-scramble (control) and with hMSCs treated with shRNA-ENPP1 is due to differences in the expression of markers of osteogenesis, including BMP2, OP, OC.

Considering that the two studies are not interdependent, they will be performed simultaneously.

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	FVB mice (subcutaneous implantation) Nude mice (subcutaneous implantation)
2	
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	Subcutaneous implantation in FVB and nude mice

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 aim of this study is twofold: **1)** to assess the osteoinductive potential of different calcium phosphate (CaP) ceramics and to correlate this potential to the expression of markers of osteogenesis *in vivo* and to the physico-chemical properties of the ceramics and **2)**, to investigate the role of a newly-uncovered protein, ENPP1, in the process of materials-induced osteoinduction, both resulting from the endogenous mouse cells, and from human mesenchymal stromal cells (hMSCs). *In vitro* studies have been performed to determine the best conditions and to select the biological factors to be investigated *in vivo*.

The general outline of an experiment is as follows:

In this animal study, we have chosen for two time points of implantations: 1-week and maximum of 10-weeks.

In our *in vitro* studies, we have chosen for 1-week time point to monitor the expression of classical osteogenic markers and ENPP1 of the cells cultured on the CaPs, for this reason, and in order to relate the *in vitro* study to *in vivo* study, we included this time point.

Based on published studies the osteoinductive materials are expected to induce bone formation between 6-and 12-weeks of implantations (1)(8). We have chosen for a maximum of a 10-weeks to evaluate bone formation on different implants.

1) The two selected CaP ceramics, hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) will be implanted subcutaneously on the back of FVB mice. Similarly, HA and TCP, loaded with hMSCs cultured on the materials will be subcutaneously implated in nude mice. The implantation site will be prepared by

creating a blunt incision on the back of each mouse and inserting the implants into the subcutaneous pockets, followed by the closer of the incision. A maximum of 4 implants will be inserted in separate pockets in each animal. The size of the implants is approximately 2-3 mm (30 mg), and the samples are not expected to enlarge during the implantation time. Considering the relatively small size of the implants, no cross-talk or influences among the conditions are expected. The implants will remain in the animal for the duration of the experiment, for a maximum of 8 weeks. Using two different CaP ceramics, with different bone regenerative capacity will enable us to understand the response of the host tissue to different materials in terms of gene and protein expression that are related to osteogenesis.

2) One of the two ceramics described under 1, TCP, which has been shown previously to have a high bone regenerative potential, will be seeded with **a)** hMSC, treated with ENPP1-scramble (control), **b)** hMSC treated with shRNA (ENPP1), **c)** TCP loaded with hMSC untreated and **d)** TCP without cells will be implanted subcutaneously in nude mice. Using established and previously published methods, these ceramic-cell constructs will be implanted subcutaneously on the back of nude mice using the procedure as described above under 1. The implantation site will be prepared by creating a blunt incision on the back of each mouse and inserting the implant into the subcutaneous pocket, followed by the closer of the incision. A maximum of 4 implants will be inserted in separate pockets in each. The size of the implants is approximately 2-3 mm, and this size is not expected to enlarging during the implantation time. Considering the relatively small size of the implants, no cross-talk among the conditions is expected. The implants will remain in the animal for the duration of the experiment, for a maximum of 8 weeks, which has been shown previously the optimal time point to study the materials-induced ectopic bone formation [3]. This study will enable the understanding of the role of ENPP1 in materials-induced ectopic bone formation, which will in turn guide the development of improved bone graft substitutes.

Following explantation, the samples from both 1 and 2 above will be analysed using qPCR for gene analysis (4), Western blotting for protein analysis (5), and immunohistochemistry to understand the spatial distribution of cells and proteins and histology and histomorphometry to determine the quality and the amount of newly formed tissue (6).

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

The proposed experiments for both study 1 and study 2 will consist of the procedures below.

Prior to the surgery, anesthesia and pre-operative pain relief will be administered to minimize the pain that may be induced by the creation of the implantation pockets. Per mouse 4 pockets will be created on the back by blunt dissection with the maximal distance between them. The ceramics will be placed in the pockets using a randomized scheme. Tissue layers will be sutured to retain the implants at the location of the implantation.

Implants, with some surrounding tissue will be removed from euthanized animals.

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

Statistics: The required number of animals per group is based on literature sources and several years of experience conducting similar experiments. Comparison between **1)** HA and TCP in FVB mice without the cells **2) HA and TCP loaded with hMSCs** in nude mice and **3) hMSC infected with shRNA-ENPP1** (treatment group), shRNA-scramble (control group), TCP loaded with hMSC and TCP without cells will be implanted subcutaneously in nude mice the analysis will be performed using the following techniques: **qPCR** for genetic analysis, **Western blot** for protein expression, **histology and histomorphometry** for tissue formation and **immunohistochemistry** for spatial expression of the selected proteins. Implanting multiple implants per animal will reduce the number of animals without leading to more discomfort to the animals. Animal sampling has been obtained by the statistical software GPower, considering statistical test, power analysis, and effect size.

Sample sizes were estimated with an a priori ANOVA calculation (G*Power). Based on our *in vitro* data, an effect of 2 ($\beta=0.8$, $\alpha=0.05$) based on our Western blot results, was calculated. A similar *in viv*

model has reported at effect size of 0,7 [1]. For comparison, standard effect sizes within orthopaedic research are 0.38-0.58, 95% CI [2]. Based on this and our *in vitro* data, an effect size of 1.5 was chosen.

B. The animals

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

Species and life stage: For the study FVB and nude mice will be used. These mice will be obtained from a commercial licensed breeder.

Mice gender: It has been shown that hormones have roles in bone growth (7) and to limit the influence of hormones during bone formation and to prevent diversity in the results we choose male mice.

Justification:

FVB mice: have shown to be able to form bone upon subcutaneous implantation of osteoinductive CaPs[1]. To investigate the early event leading to ectopic bone formation.

Nude mice: will be used due to their immunodeficient state, which makes it possible to implant hMSC – ceramic constructs. Such constructs in nude mice have previously been shown to lead to ectopic bone formation.

Maximum number of animals required:

Note: Based on our statistical calculation we need 4.5 mice per time point/material. However, the number of mice is rounded to 5 for each time point/material. As results, for two materials we need 10 mice per time point.

Condition **1**): HA and TCP without cells will be implanted in FVB mice separately. 1 mouse has 2 pockets so $n=1$ for each conditions, and based on our calculation 10 mice are required for comparing HA and TCP with $n=10$ for 1 time point with 1 technique. However, using 2 techniques and 2x time points = $10 \times 2 \times 2 = 40$ (FVB mice) in total.

Condition **2**): HA and TCP seeded with hMSC will be implanted in nude mice separately. 1 mouse has 2 pockets so $n=1$ for two conditions, and based on our calculation 10 mice are required for comparing HA and TCP with $n=10$ for 1 time point with 1 technique. However, using 2 techniques and 2x time points = $10 \times 2 \times 2 = 40$ (**nude mice**) in total.

Condition **3**): hMSC infected with shRNA-ENPP1 (treatment group), shRNA-scramble (control group), TCP loaded with hMSC and TCP without cells will be implanted subcutaneously in nude mice. 1 mouse has 4 pockets so $n=4$ for 4 conditions, and based on our calculation 5 mice are required for comparing the conditions with $n=10$ for 1 time point with 1 technique. However, using 2 techniques and 2x time points = $5 \times 4 \times 2 = 40$ (**nude mice**) in total.

Total mice needed:

FVB: 40

Nude: 80

References:

- [1] Barradas AMC, Yuan H, van der Stok J, Le Quang B, Fernandes H, Chaterjea A, et al. The influence of genetic factors on the osteoinductive potential of calcium phosphate ceramics in mice. *Biomaterials* 2012;33:5696–705.
- [2] Vavken, P., et al., The use of confidence intervals in reporting orthopaedic research findings. *Clin Orthop Relat Res*, 2009. 467(12): p. 3334-9.
- [3] Ng AMH, Tan KK, Phang MY, Aziyati O, Tan GH, Isa MR, et al. Differential osteogenic activity of osteoprogenitor cells on HA and TCP/HA scaffold of tissue engineered bone. *J Biomed Mater Res A* 2008;85:301–12.
- [4] Yang J-H, Kim H-J, Kim S-E, Yun Y-P, Bae J-H, Kim S-J, et al. The effect of bone morphogenic protein-2-coated tri-calcium phosphate/hydroxyapatite on new bone formation in a rat model of femoral distraction osteogenesis. *Cytotherapy* 2012;14:315–26.
- [5] Lau WM, Doucet M, Stadel R, Huang D, Weber KL, Kominsky SL. Enpp1: A Potential Facilitator of Breast Cancer Bone Metastasis. *PLoS One* 2013;8:1–5.

[6] Angelo M, Bendall SC, Finck R, Hale MB, Hitzman C, Borowsky AD, et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. Nat Med 2014;20:436–42.

[7] Jr GBC. The Role of Estrogen in Bone Growth and Maturation During Childhood and Adolescence 1997;61:141–4.

[8] Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, et al. Bone regeneration and stem cells. J Cell Mol Med 2011;15:718–46.

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: In this research line, we have worked for four years on *in vitro* experiments to optimize The pre-selected biomaterials and markers, as well as biochemical analyses. Nevertheless, to understand and validate the mechanism of how the cells response to different materials in the process leading to bone formation, and to be able to translate our findings to improved materials, this *in vivo* study is required.

Reduction: A statistical analysis was completed to reduce the number of animals while still gaining maximum information/data. In addition, each animal has four sites, reducing the number of animals used.

Refinement:

We used a unique approach (mass spectrometry) to identify proteins that might have significant role in bone formation in hMSC cultured on different CaPs. This approach has enabled us to design and perform the in the vivo studies more in refinement way and helped us to focus on proteins that involved in osteogenic process.

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

Before any surgical procedure the mice will be administrated with preoperative pain relief. The discomfort is estimated as mild. The surgical procedure will be performed under full anaesthesia of the animals. The animals will also receive pain relief post-operatively. The animals will be monitored daily by experienced staff. No adverse effects on the environment are expected. When using nude mice, it is essential to use antibiotics post surgery. All animals will be monitored daily. In case of infection or severe side-effects, the animal will be immediately and humanely euthanized.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

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.

All operations will be performed under aseptic conditions, anaesthesia and post-operative analgesia with usage of antibiotics (when using nude mice). **Analgesia** will be administered for at least 2 days following surgical procedures.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Nude mice are immunodeficiency mice and they are extremely vulnerable for infections and related disease. If any side effect or infections are occurred, the animals will be euthanized.

Explain why these effects may emerge.

Nude mice: implantation of CaPs subcutaneously may cause pain and infection during and after surgical procedure. Therefore, injecting adequate pain relief, see section H.

FVB mice: implantation of CaPs subcutaneously may cause pain and during and after surgical procedure. Therefore, injecting adequate pain relief, see section H.

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

Monitoring of the animals will take place daily by experience technician. **The implants are placed under aseptic conditions**. Antibiotics are used to prevent infection, and adequate pain relief delivered to reduce the pain.

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.

- Infections as a result of surgical procedures.
- Mice showing abnormal behaviour and being unable to adjust to the captive environment will immediately be euthanized.
- Weight reduction >15% in the first two days or > 20% with regard to the starting weight.
- Graft rejection by the host

Indicate the likely incidence.

Based on our previous experience, the likelihood of having an accident mentioned above is considered low.

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').

Placing mice under anaesthesia: **mild discomfort**

The implantation of screening devices: **mild discomfort**

Post-surgery: **mild discomfort**

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.

In order to explant the implants, the animals will be sacrificed at the end of the experiments.

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

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

Yes

DEC-advies PV 2016-018/ [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:** *The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice.*
3. **Titel van de NTS:** *Onderzoek naar de rol van calciumfosfaat in botregeneratie.*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC: *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl
6. **Adviestraject** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC; 15-02-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken; 24-02-2017
 - 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. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.
8. **Eventueel horen van aanvrager: N.V.T.**
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum; 02-03-2017

Gestelde vragen en antwoorden:

3 Algemene projectbeschrijving

Vraag:

1. U geeft aan dat U het belang wilt onderzoeken van endogene cellen afkomstig van muizen. Waarom past U niet mesenchymale stamcellen van muizen al dan niet voorzien van ENPP1 suppressie via smRNA dan wel smRNA scramble toe? Het voordeel zou kunnen zijn dat gebruik gemaakt kan worden van immuuncompetente muizen.

Antwoord:

All our preclinical *in vitro* experiments were performed using clinically relevant human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. This is why we choose to use these cell in the *in vivo* experiments as well. Furthermore, we have performed some preliminary experiments with murine cells, and culture on HA and TCP did not show as pronounced differences in ENPP1 expression as did human cells, which is another reason to choose human cells for these experiments.

3.3. Belang

Vraag:

1. U geeft aan dat vooral ouderen baat zullen hebben bij verbeterde bot-regenererende materialen. De DEC-UM vraagt zich af of mesenchymale stamcellen in alle leeftijden even goed aanslaan? Wat is Uw visie op de invloed van leeftijd op het succes van de regeneratieve vermogens van de materialen + mesenchymale stamcellen die U wilt gaan gebruiken?

Antwoord:

Previous research has shown that aging may reduce the proliferation and differentiation potential of adult stem cells, however, other factors, including genetic factors play a role too.. The approach we are testing with this study is specifically designed to attract and induce the endogenous stem cells of the patient to differentiate into the osteogenic lineage and form new bone, to enhance the self-regenerative potential of the body. The need for enhanced regeneration is relevant for patients of all ages, as trauma, spinal fusion or tumour removal are not exclusively age-related treatments. Nevertheless, as we age, the incidence of such clinical conditions may increase.

3.4.3

Vraag:

1. U gaat in onderdeel A kijken naar de expressie van verschillende botmarkers. Vervolgens heeft U er al voor gekozen om in onderdeel B te gaan kijken naar de marker ENPP1. Bestaat er een kans dat U ook andere markers gaat vinden in onderdeel A die U dan vervolgens mee zou willen nemen in onderdeel B? Wilt U dit niet meteen al meenemen in deze aanvraag? (In dat geval is er wel een go-no go punt tussen onderdeel A en B?)

Antwoord:

In section A, only ceramic materials, without cells will be implanted. In addition to analysing markers of osteogenic differentiation, we will also investigate the ability of the materials to induce new bone formation in the absence of implanted cells, i.e. their intrinsic osteoinductive potential. Part B, where the cells will be implanted, is more specifically focused on understanding the role of ENPP1 *in vivo*. Furthermore, the two parts use different mouse strains, showing that the two studies are related, but not dependent on one another, and therefore no go-no go decision is needed/can be taken. Nevertheless, the design of part B study also allows for the analysis of other osteogenic markers, co-expressed with ENPP1.

3.4.4

Appendix 1

Algemene opmerking:

1. Zijn 4 pockets in 1 muis inderdaad $n=4$? Normaal wordt het dubbel implanteren van een implantaat met dezelfde eigenschappen in 1 dier gezien als een duplicaat, niet als een $n=2$. Kunt u toelichten waar uw keuze op gebaseerd is?

Reactie:

The sample numbers have been adjusted!

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

Vraag:

1. Welke analyse verricht met een Western blot gebruikt U als uitleesparameter teneinde de groepsgroottes te bepalen in de power analyse? Ligt toepassing van uitleesparameters vanuit de qPCR niet meer voor de hand daar de VC in deze analyse geringer lijkt?

Antwoord:

Generally, the results of Western blot analyses are considered more predictive for the in vivo outcome in this type of research, which is these results were selected to calculate the sample size.

Vraag:

2. U geeft in het eerste gedeelte aan dat de dieren maximaal 10 weken met implantaat zullen zijn. Echter onder 1) en 2) spreekt U over een maximum van 8 weken. Kunt U dit uitleggen?

Antwoord:

This is indeed a mistake in the test. The correct maximal implantation time should be 10 weeks for all sections.

B. De Dieren.

Vraag:

3. Uw reden om alleen mannen te gebruiken is de rol van hormonen op botgroei. Hebben mannen ook vaker implantaten nodig dan vrouwen? Zou het niet juist interessant zijn om te weten wat de verschillen tussen mannen en vrouwen zijn om zo een idee te krijgen over hoe de materialen uiteindelijk in de kliniek aan zullen slaan bij zowel mannen als vrouwen?

Antwoord:

The is indeed a valid reason to use both male and female animals. Nevertheless, at this stage of research, that is focused on more fundamental understanding of the role of materials and specific proteins in materials-induced bone formation, it is important to exclude other factors, such as hormonal interference. At a later stage of research, the gender effect on the treatment would indeed be an interesting research question.

F. Huisvesting en verzorging.

Vraag:

4. Is er kans dat de muizen aan elkaars wondjes gaan bijten?

Antwoord:

Based on our previous experience with similar type of implantations in mice, the chance of mice biting/opening the wounds of other mice is limited.

Nevertheless, following the surgery, the mice will be monitored on a daily basis, and in case this happens, precautions will be taken in agreements with animal care personnel.

H. Pijn en pijnbestrijding.

Vraag:

5. Bestaat er een mogelijkheid dat de pijnstilling de expressie van botmarkers zal beïnvloeden? En antibiotica (genoemd onder I)?

Antwoord:

To the best of our knowledge, there is no evidence that the pain killers or antibiotics influence the extent of bone formation or the expression of the markers of osteogenesis (in contrast, for example to some NSAID's). Nevertheless, even if there is an effect that we are not aware of, it will similarly influence the control groups and the study groups, and therefore a comparison can still be made.

J. Humane eindpunten.

Vraag:

6. Wat bedoelt U met “unable to adjust to the captive environment”?

Antwoord:

This means abnormal behaviour, including spinning, being very quiet, weight loss, as a result being within a cage for a period of maximal 10 weeks.

Vraag:

7. Wat is een waarschijnlijkheid ‘laag’?

Antwoord:

These are general symptoms that might occur after any surgery. However, based on our previous in vivo studies none of these symptoms have been reported.

- Datum antwoord; 23-03-2017
- Verstrekte antwoorden; zie hierboven
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts: *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 aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren.

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. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelestellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van fundamenteel onderzoek.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

Het directe doel van het project is het bepalen van de rol van Ectonucleotine Pyrophosphatase 1 (ENPP1) bij botvorming, met behulp van 2 typen keramische implantaten die erkend regeneratief potentieel hebben bij botten, en die al dan niet geladen zijn met uit menselijk beenmerg gewonnen mesenchymale stromale cellen (hMSCs).

Het uiteindelijke doel is het maken van betere botssubstituten gebaseerd op het stimuleren van het zelf-regeneratieve potentieel van het lichaam.

Het betreft hier een fundamenteel project.

Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het waarschijnlijk dat er belangrijke stappen richting het uiteindelijke doel gezet kunnen worden binnen de duur van dit project.

De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.

Uit de aanvraag blijkt er dat er behoefte bestaat aan betrouwbare behandelingsmethoden bij grote botdefecten die veroorzaakt worden door bijvoorbeeld trauma, of verwijdering van tumoren. Hoewel de beste optie voor het behandelen van dergelijke defecten nog steeds patiënt-eigen bot (autograft) is, brengt deze methode veel nadelen met zich mee zoals verhoogde kans op infecties en langere operatietijd. Daarom is er een toenemende vraag is naar veilige en goedkope alternatieven.

De DEC-UM is derhalve van mening dat het directe doel, het bepalen van de rol van Ectonucleotine Pyrophosphatase 1 (ENPP1) bij botvorming, met behulp van 2 typen keramische implantaten die erkend regeneratief potentieel hebben bij botten, en die al dan niet geladen zijn met uit hMSCs, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

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 wetenschappelijke project, dat gericht is op het verkrijgen van wetenschappelijke kennis over de biologische mechanismen die ten grondslag liggen aan botgroei en botregeneratie, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de medische wetenschap.

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 licht ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen over mechanismen die van belang zijn bij het stimuleren van botregeneratie.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Hoewel dit project fundamenteel wetenschappelijk van aard is, kunnen positieve resultaten de weg wijzen naar de ontwikkeling van klinisch relevante behandelingsmethoden voor botdefecten.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling 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 beoordeling 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 of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling 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 richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt F in de bijlagen.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

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. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

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 van de proef.

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 beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

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.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn.

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. Licht uw beoordeling toe.

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 beoordeling 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 zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. 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. Licht uw beoordeling toe.

Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

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. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).

De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De DEC-UM is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met dergelijke dieren uit te voeren.

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 richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling 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 niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.V.T.**

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 onderzoeken van de rol van ENPP1 bij botvorming om uiteindelijk betere botssubstituten te kunnen maken, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "*The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice*"?

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: *licht nadeel*.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *reëel voordeel*.

Algemeen: *relevante groei van medische kennis*.

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de onderzoekers en de medische wetenschap binnen het project "*The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice*" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na licht ongerief.

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 bijdragen aan kennis over het stimuleren van botregeneratie. Deze kennis is van belang voor de ontwikkeling van nieuwe, veilige en betaalbare, methoden voor de behandeling van botdefecten.

Er is ook behoefte aan dergelijke therapieën als alternatief voor methoden met patiënt-eigen lichaamsmateriaal.

Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM het onderhavige onderzoek van reëel belang.

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. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het onderzoeken van de rol van ENPP1 bij botvorming om uiteindelijk betere botssubstituten te kunnen maken, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "*The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice*"? 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 reële 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.



> 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
AVD1070020171684

Bijlagen

2

Datum 10 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 9 mei 2017. Het gaat om uw project "The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1070020171684. 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:

10 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1070020171684

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
10 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020171684

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

E-mailadres: ivd-secretariaat-cpv@maastrichtuniversity.nl

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: 15 april 2017
Geplande einddatum: 15 april 2020
Titel project: The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de rol van calciumfosfaat in botregeneratie
Naam DEC: DEC UM
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD Maastricht
E-mailadres DEC: secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
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: 9 mei 2017

Datum:
10 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020171684



> 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
AVD1070020171684
Bijlagen
1

Datum 12 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 9 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice" met aanvraagnummer AVD1070020171684. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

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

U kunt met uw project "The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 juni 2017 tot en met 15 april 2020.

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 9 mei 2017. 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 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:
12 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020171684

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:


H. 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: Universiteit Maastricht
Adres: Postbus 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 juni 2017 tot en met 15 april 2020, voor het project "The role of ENPP1 in bone formation induced by calcium phosphate-based ceramics upon ectopic implantation in mice" met aanvraagnummer AVD1070020171684, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC UM. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 mei 2017, ontvangen op 9 mei 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Subcutaneous implantation in FVB and nude mice				
	Muizen (Mus musculus) / n=40 FVB & n=80 nude muizen	120	100% Licht	

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.

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

Aanvraagnummer:
AVD1070020171684

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:
AVD1070020171684

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:
AVD1070020171684

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 W17-11										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20171744	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x	x	x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven initieel				x	x		x		
5	DEC advies			x						
6	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x			
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
8	Bijlage beschrijving dierproeven aangepast				x	x		x		
9	Adviesnota CCD		x						x	
10	Beschikking en vergunning				x		x			



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	11514
		<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	UMC Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	30244197
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	
		Functie	Senior Scientist
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 7 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 7 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Synerkines: een platform voor potentieel nieuwe medicijnen tegen ontsteking
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568 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 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



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.

Cytokines that control inflammation, such as interleukin-4 (IL-4) or interleukin-10 (IL-10) hold promise for clinical application since they turn off inflammatory cells and inhibit the release and production of multiple mediators such as cytokines, proteases, and oxygen radicals.

The regulatory role of cytokines in inflammation and their involvement in various pathogenic

inflammatory conditions is well described (Becher B et al, Wynn TA et al). More recently the role of cytokines in neuroinflammatory processes was revealed. These studies showed that pro-inflammatory cytokines play a role in persistent pain states and may represent potential therapeutic targets in these conditions (Eijkelkamp et al).

The potency of recombinant cytokines as therapeutics has also been tested before (Asadullah K et al). However, cytokines are, due to their relatively low molecular weight of <20 kDa, known for their limited bioavailability, since proteins smaller than 45 kDa, dependent on their molecular size, are rapidly cleared from the circulation by the kidneys. Besides that, cytokines used as stand-alone drug do not optimally inhibit inflammation; often synergy with other anti-inflammatory cytokines is required. Cytokine pathways are often redundant and the effect of two cytokines might be needed to target this, in order to retrieve the required biological effect. The potential offer by double targeting was recently shown by the promising results achieved with a bispecific monoclonal antibody dupilumab that inhibits both IL-4 and IL-13 (Vatrella A et al).

██████████ a technology platform to solve the limitations of regulatory cytokines, and designed a prototype of a new class of cytokines, called synerkines. Synerkines are ██████████ resulting in improved anti-inflammatory properties and improved bioavailability.

As proof of concept ██████████ an IL4-10 synerkine, and demonstrated that it has full IL-4 and IL-10 activity. It is expected that increasing the molecular weight of the cytokines IL-4 (15 kDa) and IL-10 (a non-covalently linked homo-dimer of 37 kDa) by linking them to each other, will significantly improve bioavailability, since a dimer of the IL4-10 synerkine has a theoretical molecular weight of at least 67 kDa, preventing the synerkine from clearance by the kidney.

The IL4-10 synerkine has been evaluated in several disease models, both *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. IL4-10 was shown to inhibit blood-induced cartilage damage *in vitro* showing promise for the treatment for bleeding-associated cartilage damage (van Vulpen et al). Furthermore, IL4-10 demonstrated to exert therapeutic effect in a mouse model of persistent pain, which was shown to be superior as compared to the combination of the single cytokines (Eijelkamp et al). In conclusion, the IL4-10 synerkine has therapeutic potential for the treatment of ██████████ chronic pain, inflammatory diseases or disorders, and related diseases and disorders.

██████████ the synerkine ██████████

Cytokine networks in neuroinflammation.

Becher B, Spath S, Goverman J.

Nat Rev Immunol. 2017 Jan;17(1):49-59. doi: 10.1038/nri.2016.123. Review.

Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies.

Wynn TA.

Nat Rev Immunol. 2015 May;15(5):271-82. doi: 10.1038/nri3831. Review.

IL4-10 Fusion Protein Is a Novel Drug to Treat Persistent Inflammatory Pain.

Eijkelkamp N, Steen-Louws C, Hartgring SA, Willems HL, Prado J, Lafeber FP, Heijnen CJ, Hack CE, van Roon JA, Kavelaars A.

J Neurosci. 2016 Jul 13;36(28):7353-63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0092-16.2016.

Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach

K. Asadullah, W. Sterry, and H. D. Volk

Pharmacological Reviews June 2003, 55 (2) 241-269.

Dupilumab: a novel treatment for asthma.

Vatrella A, Fabozzi I, Calabrese C, Maselli R, Pelaia G.

J Asthma Allergy. 2014 Sep 4;7:123-30. doi: 10.2147/JAA.S52387. eCollection 2014.

A fusion protein of IL4 and IL10 (IL4-10 synerkine), is very effective in protecting cartilage from blood-induced damage

L.F. van Vulpen, M.E. van Meegeren, C. Steen-Louws, C.E. Hack, S.C. Mastbergen, F.P. Lafeber

Osteoarthritis and Cartilage, April 2014 Volume 22, Supplement, Page S483

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 objective of this project is to assess the bioavailability of [REDACTED] synerkines, such as IL4-10, compared to the respective cytokines alone, such as recombinant IL-4 and IL-10.

[REDACTED] synerkine [REDACTED] synerkines. [REDACTED] synerkine [REDACTED]

Determination of the plasma half-life of a macromolecule in rats can be considered standard practice and is rather straightforward. In the past we have performed pilot experiments, where we were able to specifically detect human synerkines and the individual cytokines in rat plasma.

The development of synerkines within our institute is being led by an expert immunologist with an outstanding academic track record in the field of inflammation who has also gathered ample experience in development of therapeutic proteins. We have extensive diverse collaborations with researchers within and outside the UMCU. Via these researchers we have access to a network of clinicians.

3.3 Relevance

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

Existing drugs are not always effective in patients suffering from auto-immune or inflammatory diseases indicating the medical need to develop novel, potent and safe anti-inflammatory drugs. A group of patients with e.g. inflammatory pain or neurological persistent pain, currently receives treatment for pain-relief, since no treatment options for the underlying disease are available. Synerkines, based on endogenous natural anti-inflammatory molecules, may represent those novel drugs. Scientifically it will also add to our knowledge. [REDACTED] synerkine [REDACTED]

3.4 Research strategy

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

A. Generation and *in vitro* characterisation of the synerkines

Cytokines with a well-defined biological function are combined in a novel format using a linker sequence, termed synerkines. Synerkines are produced in recombinant expression systems and are extensively characterized biochemically as well as in a variety of *in vitro* functional assays using (isolated) human cells or tissue (for instance using blood from healthy donors). The biological activity of the individual cytokines within the synerkines will be assessed and compared to combinations of equal amounts of the cytokines. [REDACTED] synerkines [REDACTED]

B. Bioavailability of synerkines in rats

The bioavailability of the [REDACTED] synerkines and [REDACTED] will be tested in rats. To this end rats will be injected with synerkines using different routes of administration and the concentration of synerkines will be determined in serial plasma samples. The bioavailability of synerkines will directly be compared to individual cytokines making up the synerkine. It is expected that the increase of molecular

size will translate to a better bioavailability because of decreased filtration via the kidney. In pilot experiments using single injection we will test the effect of different administration routes. Next, we will test repeated injection of synerkines.

[redacted] synerkines [redacted]

Whenever possible we will test the cross-reactivity of the human cytokines with rat cytokine receptors. It is expected that binding to cellular receptors will only have a minor effect on the bioavailability.

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.

A. Generation and *in vitro* characterisation of the synerkines

No animal procedures will be involved.

B. Bioavailability of synerkines in rats

Injection of pre-treatment and/or withdrawal of blood samples (time point zero). Single or multiple injection of synerkines (i.v., i.p., s.c., intraarticular, intracranial, intrathecal), repeated blood withdrawal at multiple time points to assess circulating synerkine levels. In case of repeated blood withdrawal within a short period of time rats will be cannulated and anesthetized. At the end of the experiment organs will be collected to analyse distribution of cytokines in the different compartments.

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.

We plan to study the bioavailability of the IL4-10 synerkine [redacted] synerkines [redacted]. Generation and *in vitro* characterization of the biological activity of [redacted] synerkine (described in part A) is a prerequisite to proceed with the *in vivo* studies. Only synerkines that show biological activity *in vitro* will be tested bioavailability studies (part B).

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	Bioavailability of synerkines
2	
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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Bioavailability of synerkines

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 aim of these experiments is to assess the bioavailability of [REDACTED] synerkines in rats. The primary outcome parameter will be concentration of synerkine and individual cytokines measured in rat plasma.

The bioavailability of synerkines will be compared to the bioavailability of the individual cytokines. [REDACTED] synerkine [REDACTED] will be injected in wild type rats using different routes. At different time points after injection, blood will be withdrawn, plasma or serum will be isolated and the concentration of the synerkine or cytokines will be measured. The pore size of the filtration barrier in the kidneys of humans and rats is compatible, therefore the bioavailability of synerkines in rats can be used to predict their behavior in humans. However, [REDACTED], and the contribution of this to the clearance pattern depends on how strongly human synerkines bind to the respective rat cytokine receptors. To test the involvement of receptors that are involved in clearance of synerkines [REDACTED], some animals will be pre-treated with [REDACTED]

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

Blood withdrawal to collect pre-sample, injection of pre-treatment (optional). Injection of [REDACTED] synerkines [REDACTED] or individual cytokines (subcutaneous, intravenous, intraperitoneal, intrathecal, intra-articular). Blood withdrawal (max 150ul / time point) will be carried out at different time points, but in total max 8 times. Three rats will be used per time point. Alternated rats will be used to avoid too frequent blood withdrawal. The maximal amount of blood withdrawn will always

remain below 8mL/kg in a period of 2 weeks. At the end of the experiment rats will be euthanized and organs will be removed for analysis of the biodistribution of synerkines.

Depending on the plasma half-life of the synerkine the time points for blood withdrawal vary. For example the optimal time points to determine the plasma half-life of synerkines with [REDACTED] would be 5', 10', 15', 20', 30', 1h and 2h. For such short term experiments (less than 2 hours) involving repeated blood withdrawal, rats will be anesthetized with 2.5% isoflurane and the tail vein will be cannulated (using Abocath).

To study the bioavailability of synerkines [REDACTED], rats will be followed for a longer period (up to 4 weeks) and blood will be collected. In case of less frequent sampling time points we will consider using a recently described blood withdrawal technique (using a "vlindernaald", see link below). <http://www.ivd-utrecht.nl/nl/goede-voorbeelden/bloedafnametechniek-verfijnt-dierproef-rat/#%20Bloedafnametechniek%20verfijnt%20dierproef%20rat>

The optimal time points for blood withdrawal for [REDACTED] synerkine will be determined in pilot experiments. Usually the distribution of proteins is characterised by a distribution phase ($t_{1/2\alpha}$) and an elimination phase ($t_{1/2\beta}$). Based on the pilot experiments for [REDACTED] synerkine we will adjust blood withdrawal in the subsequent experiments so that sufficient sampling time points will fall in the expected phases enabling accurate determination of these values.

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

Statistical analysis is generally not used in PK studies. After each experiment we will critically evaluate the variation, the optimal time points for blood withdrawal and the group sizes in order to gather meaningful results with the least amount of rats possible. Previous experiments using IL4-10 synerkine suggest that at least three animals per time point is needed for reliable results.

B. The animals

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

Wistar Crl:WI rats (male or female) obtained from Charles River (or other registered commercial breeder within the EU) will be used. Adult rats will be used (between 8 and 20 weeks). Three rats will be bled per time point, so at least 6 animals will be used per group, this is based on our previous experience. Rats are generally accepted as models for PK studies in humans. The reason for this is that the rats are large enough for repeated blood withdrawal and the biodistribution of most drugs in rats accurately predicts their characteristics in humans.

We plan to test [REDACTED] synerkines: IL4-10 [REDACTED] synerkines. [REDACTED] synerkine [REDACTED]. Additionally, mouse, rat and canine variants of the synerkines could be tested to complement efficacy studies in the respective animal models.

The approximate design of a typical series of experiments for one synerkine would look as follows.

Experiment 1

Aim

To test improved bioavailability of IL4-10 compared to individual cytokines after i.v. injection.

Setup

Group A: recombinant IL-4

Group B: recombinant IL-10

Group C: IL4-10 (dose 1)

Group D: IL4-10 (dose 2)

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

Expected outcomes

→ Improved bioavailability by synerkine compared to individual cytokines.

→ Optimal dose and sampling time points will be determined.

Experiment 2

Aim

To test bioavailability of [REDACTED] and bioavailability after s.c. injection.

Setup

Group A: IL4-10 i.v.

Group B: IL4-10 ([REDACTED])

Group C: IL4-10 ([REDACTED])

Group D: IL4-10 s.c.

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

Expected outcomes

→ Detection of [REDACTED] bioavailability by [REDACTED] synerkines [REDACTED] synerkine.

→ Bioavailability after s.c. injection.

Experiment 3

Aim

To provide evidence for altered clearance rates. [REDACTED] that thought to be involved in clearance of synerkines [REDACTED] before the experiment (pre-treatment).

Setup

Group A: IL4-10 [REDACTED] i.v.

Group B: IL4-10 [REDACTED] i.v. + pretreatment

Group C: IL4-10 [REDACTED] i.v.

Group D: IL4-10 [REDACTED] i.v. + pretreatment

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

Expected outcomes

→ The mechanism underlying altered bioavailability by [REDACTED] synerkines is unravelled.

Experiments 4-7

Additional experiments using altered time points for blood withdrawal, different route of administration, different dose, using [REDACTED]. Based on the outcome of experiments 1-3, we will consult with the IvD about the exact design of these follow up experiments and these will be described in detail in the work protocol.

We would like to stress that we do not expect that for [REDACTED] synerkine variant after each experiment it will be evaluated whether further studies are necessary. [REDACTED]

[REDACTED] synerkine [REDACTED]

We expect that we will perform maximal 8 experiments per year (192 rats per year).

Therefore we expect that we will use maximally 960 rats in the coming 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 bioavailability of macromolecules is influenced by a wide range of factors, including but not limited to size of the molecule, charge, [REDACTED] etc.

Therefore it is not possible to accurately predict the behaviour [REDACTED] synerkines *in vivo* based on only *in vitro* studies. We will perform extensive analysis *in vitro* on [REDACTED] synerkine before proceeding to the *in vivo* experiments. To be able to perform human studies a clean synerkine batch should be produced which is out of scope of the current study.

Reduction: Based on our previous experience we expect that three animals per time point is sufficient to obtain reliable results. Nevertheless, after each experiment we will evaluate the group sizes. We will also critically look at the data and in case of no improvement by [REDACTED] synerkine [REDACTED] compared to the individual cytokines the experiment will not be repeated.

Refinement: The pharmacokinetics of proteins in rats is well accepted and yield relatively robust data. All experiments will be carried out by experienced technicians or researchers.

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

Animals will be kept in groups wherever possible. For short term experiment, animals will be anesthetized during the entire experiment. All handlings will be performed by experienced animal technicians or researchers.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

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.

For short term experiments (less than 2 hours) involving repeated blood withdrawal, rats will be anesthetized with 2.5% isoflurane and the tail vein will be cannulated (using Abocath)

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We do not expect any adverse effect on the animals' welfare based on some limited previous experiments.

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

It is not likely but we cannot rule out that in studies after the injection of synerkines antibodies are formed against the synerkines, which upon repeated injection may cause anaphylactic reaction. We will assess the generation of antibodies after single injection. When repeated injection of synerkines will be applied, animals will be carefully monitored for signs of anaphylaxis (e.g. fast breathing). Such reaction will be considered a humane end point.

Indicate the likely incidence.

Less than 5%.

K. Classification of severity of procedures

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

Injection of synerkines represents mild discomfort. Repeated blood withdrawal represents mild discomfort.

We expect that most animals (80%) will experience mild discomfort despite the combination of procedures. In the rest of the rats, e.g. when pretreatment will be applied or when animals are bled for the assessment of antibody titers, the cumulative discomfort may be 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.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : DEC 2017.II.514.013
2. Titel van het project : Synerkines: novel anti-inflammatory drugs to inhibit immunopathology and (inflammatory) pain.
3. Titel van de NTS : Synerkines: een platform voor potentieel nieuwe medicijnen tegen ontsteking.

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
- Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
- Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 07-04-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 19-4-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 25-04-2017 / 05-05-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 08-05-2017

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- niet van toepassing

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 25-04-2017
- Datum antwoord: 05-05-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.2 Doel: Het is de DEC niet helder waarop de keuze berust voor het testen van de biologische beschikbaarheid van ██████████ synerkines. Is dat op basis van capaciteit?

The IL4-10 synerkine, which is in detail discussed in our application, is the furthest developed synerkine variant. Based on the promising results with this molecule we have initiated development of [REDACTED]. These are either being developed or will be developed. The [REDACTED] synerkine is indeed mainly based on the [REDACTED] of our group to [REDACTED] [REDACTED] and in vitro characterize the different synerkine variants in the coming 5 years.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Wat is het criterium voor de biologische activiteit van het gemaakte synerkine op grond waarvan u beslist tot het doen van de in vivo proeven?
All the synerkines were and will be extensively tested in vitro in different potency assays before being used in in vivo experiments. Any given synerkine should demonstrate biological activity in vitro of both cytokines and this activity should at least be comparable to the activity of one of the individual cytokines alone. The reason for this criteria is that by expressing two individual cytokines in the form of a fusion protein (synerkine) it is possible that the [REDACTED] [REDACTED]. Likewise, the [REDACTED] binding to the responsible [REDACTED] may be affected. This could result in a decreased biological functions of one of the cytokines in the synerkine. However even when the biological effect of a given synerkine in vitro is comparable to one of the single cytokines, better in vivo efficacy is expected due to the improved bioavailability caused by the increase of the molecular weight.

Bijlage 1:

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is de DEC niet helder hoe u aan de aantallen komt. De DEC zou graag meer inzicht krijgen in de berekening van het aantal benodigde dieren. Ook mist de ratio voor de factor 3 en vraagt de DEC zich af of u niet te weinig dieren aanvraagt.
What we provided in Attachment 1 are example experiments to illustrate the approach we plan to use to systematically assess the bioavailability of the generated synerkines. The setup of experiments 1 to 3 are provided and the following experiments will be designed based on the outcome of these studies. We may decide to omit or include groups. Should any given synerkine variant show no improved bioavailability compared to the individual cytokine, the in vivo experiments with that variant will be terminated.

Niet Technische Samenvatting

- 4.1 Vervanging: De zin: "Bovendien zouden we daarvoor over zeer schone preparaten van het synerkine moeten beschikken en dat is niet praktisch haalbaar voor de verschillende varianten". Deze formulering suggereert dat je in dieren wel vieze preparaten kunt gebruiken. Graag herformuleren.
We apologize for the unfortunate formulation. Generally the quality of candidate drugs which are injected into healthy human volunteers is substantially higher than the quality of compounds used for preclinical mouse studies. For humans GMP-compatible production of the synerkine would be required which is way out of the scope of this proof-of-concept study (especially

considering [REDACTED]). Obviously, all the synerkines will be produced aseptically in [REDACTED], sterile filtered and subjected to extensive quality control (i.e. SDS-PAGE, HPLC, stress test, activity assays). The text is adjusted in the NTS.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- nvt

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren en de benodigde expertise op wetenschappelijk gebied is aanwezig binnen de DEC.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat, waarbij de projectbeschrijving en de bijlage beschouwd kunnen worden als één projectaanvraag. De voorgestelde experimenten zijn naar de mening van de commissie logisch en helder opgeschreven en beargumenteerd en zijn nodig om het beoogde concrete resultaat te bereiken. Alle stappen in het project zijn voldoende uitgewerkt, met duidelijke uitkomstparameters en bevatten geen onzekerheden. Gezien bovenstaande is de DEC van oordeel dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 4B uit de "Handreiking Invulling Definitie Project".
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, het onderzoeksveld, patiënten die leiden aan onstekings ziekten en de samenleving. De morele waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de ratten zal worden aangetast omdat stoffen worden toegediend, bloed wordt afgenomen en uiteindelijk het dier zal worden gedood. Het onderzoeksveld zal meer kennis verkrijgen in de biobeschikbaarheid en

het werkingsmechanisme van synerkines (twee aan elkaar gekoppelde cytokines) die uiteindelijk in de mens op werkzaamheid zullen worden onderzocht. De wetenschappelijke status is van belang voor het onderzoeksveld, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. De morele waarden die voor de patiënten leidend aan ontstekingsziekten zoals auto-immuunziekten bevorderd worden: op korte termijn kan hun gezondheid en lichamelijke conditie worden verbeterd en de pijn worden verminderd indien synerkines toepasbaar blijken te zijn. Deze therapie zal daardoor een significantie bijdrage kunnen leveren aan de morbiditeit en de kwaliteit van leven van de patiënten die leiden aan ontstekingsziekten zoals auto-immuunziekten. De samenleving heeft baat bij dit onderzoek omdat deze nieuwe behandelmethodede de ziekte in de kern aanpakt en bij succesvolle behandeling enorme kosten bespaart op ziektekosten.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De onderzoeksgroep heeft ruime ervaring met deze modellen en de beschreven read-out parameters en met significante publicaties op dit gebied. De groep heeft veel samenwerkingen met onderzoekers (zowel biomedici als clinici) binnen en buiten het UMCU op het gebied van ontstekingsziekten. De eerste 2 series experimenten moeten bio-beschikbaarheid via twee verschillende toedieningsroutes in de juiste dosering opleveren. Het laatste experiment zal het mechanisme achter het gebruik van de synerkines ontrafelen.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Daar dit een samenwerkingsproject betreft, geeft het voor de DEC aan dat het een haalbaar project is en er al een beoordeling over de haalbaarheid heeft plaatsgevonden.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)

- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

Alle dieren worden betrokken van erkende fokkers of in huis gefokt, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik of gebruik van bedreigde diersoorten of in het wild gevangen dieren. De toegepaste methoden voor anesthesie en euthanasie zijn conform de richtlijn.

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. De proefdierfaciliteiten voldoen aan het gestelde in de richtlijn en betrokken medewerkers (dierverzorgers, biotechnici en onderzoekers) zijn allen bevoegd en bekwaam.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De experimentele dieren ontvangen een injectie met een synerkine of een controle middel waarna er op regelmatige tijden bloed wordt afgenomen al dan niet onder terminale anesthesie. De meerderheid van de dieren (80%) ondervindt daarbij mild ongerief en een klein deel (20%) matig. De DEC vindt de inschatting van het ongerief in overeenstemming met het ongerief zoals dat is ingeschat door de onderzoekers.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door de handelingen die worden uitgevoerd, zoals het toedienen van de syberkines of vehicula als controle, het afnemen van bloedmonsters om het gehalte synerkine te bepalen en uiteindelijk de euthanasie voor het verkrijgen van weefsels.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat: wat eventueel aanleiding kan zijn tot dusdanig lijden van het dier dat verder lijden moet worden voorkomen door het toepassen van een humaan eindpunt, zoals onverwachte bijeffecten van de herhaald toedienen van een synerkine en het optreden van een anafylactische shock hetgeen overigens niet wordt verwacht. De humane eindpunten zijn helder beschreven en ook voor de biotechnici te interpreteren en toe te passen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Een bio-beschikbaarheids onderzoek is in vitro niet na te bootsen evenmin als de farmaco-kinetiek en farmaco-dynamiek, waardoor het metabole systeem van een zoogdier noodzakelijk is. Het geheel van biologische systemen is nog niet in vitro na te bootsen.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Voor alle bijlagen is een correcte berekening gemaakt en volgens gangbare statistische methoden berekend voor de experimenten.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De onderzoekers beschikken over meer dan ruime ervaring met alle uit te voeren handelingen. Daar waar, tijdens de studie door voortschrijdend inzicht, experimentele condities kunnen worden geoptimaliseerd (bv. dosis, tijdschema, groepsgrootte), zal dat worden toegepast.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet voor alle experimenten. De aanvrager heeft dit in voldoende mate wetenschappelijk onderbouwd. De aantallen zijn gebaseerd op aantallen dieren waarvan in de tijd bloed moet worden afgenomen en gebaseerd op eerdere ervaringen. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven dieren uit te voeren waarbij beide geslachten kunnen worden gebruikt.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. De dieren die voor de experimenten worden gebruikt worden gedood omdat na afloop van het experiment de organen moeten worden uitgenomen voor verdere analyse. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel de ratten moeten worden gedood is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is: rechtvaardigt het onderzoek naar de bio-beschikbaarheid van synerkines (met als doel in humane patiënten gebruikt te kunnen worden bij ontstekingsziekten zoals auto-immuunziekten) het gebruik van proefdieren op een

manier die de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2. Er vindt voor 80% van de proefdieren een beperkte aantasting van welzijn en integriteit plaats, met maximaal licht ongerief en voor een kleiner deel van de proefdieren vindt een redelijke aantasting van welzijn en integriteit, met maximaal matig ongerief. Maar de waarde voor de doelgroep (de patiënten) is groot.

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat een grote groep patiënten die nu nog leiden aan de gevolgen van auto-immuunziekten beter geholpen kunnen worden met specifiekere middelen met minder bijwerkingen. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden, omdat bij het vaststellen van goede bio-beschikbaarheid in vivo in een zoogdier de overstap naar verder onderzoek in de mens in principe plaats kan vinden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat de doelstelling van dit project een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit essentiële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het project is helder beschreven en de DEC is van mening dat de voorgestelde experimenten en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak zullen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van dit project. De DEC is verder van mening dat de onderzoeksgroep meer dan voldoende ervaring heeft om met dit project de doelstelling te behalen met in acht neming van de 3 V's. De DEC onderschrijft daarmee dat het gestelde doel niet zonder gebruik van proefdieren is te behalen. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht
Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1150020171744
Bijlagen
2

Datum 17 mei 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 mei 2017. Het gaat om uw project "Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020171744. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

17 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020171744

Datum:

17 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020171744

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
KvK-nummer: 30244197
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 
Functie: Senior Scientist
Afdeling: 
Telefoonnummer: 
E-mailadres: 

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Datum:

17 mei 2017

Aanvraagnummer:

150020171744

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juli 2017

Geplande einddatum: 1 juli 2022

Titel project: Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs

Titel niet-technische samenvatting: Synerkines: een platform voor potentieel nieuwe medicijnen tegen ontsteking

Naam DEC: DEC Utrecht

Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagenVerplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvattingOverige bijlagen: DEC-advies**Ondertekening**

Naam:

Functie: decaan

Plaats: Utrecht

Datum: 15 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 80.011
3508 Ta UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1150020171744
Bijlagen
2

Datum 17 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 17 mei 2017
Vervaldatum: 16 juni 2017
Factuurnummer: 171744
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020171744	€ 1035,-

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: [REDACTED]
Verzonden: maandag 29 mei 2017 10:46
Aan: 'Info-zbo'
CC: info@ivd-utrecht.nl
Onderwerp: RE: vragen bij de behandeling van AVD11500201744
Bijlagen: 2017 05 29 appendix-description-animal-procedures-1.3 synerkines (K).docx

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED],
 hierbij onze antwoorden op de vragen van de CCD
 -naar mij weten is punt L volledig ingevuld in de bijlage. Echter, bij punt K ontbrak de tekst wegens een softwarefout in de document. Ik heb nu alle tekst naar een lege bijlage gekopieerd en punt K op z'n plek ingevuld.

[REDACTED] is nu verwijderd van de bijlage.

-Mannen en vrouwen zijn in principe beide geschikt voor deze experimenten, want we verwachten geen effect van het geslacht op de uitkomst parameters. Wij gaan binnen een experiment alleen mannen of vrouwtjes gebruiken om de variatie te verkleinen. Ik heb hierover een extra zin in de bijlage gezet (bij punt B).

-In silico modeling voordat de PK studies worden ingezet is geen onderdeel van onze onderzoekstrategie. De synerkines zijn nieuwe moleculaire entities en hun PK kan niet op voorhand worden voorgespeeld.

Met vriendelijke groeten,
 [REDACTED]

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: dinsdag 23 mei 2017 15:15
To: [REDACTED].
Cc: info@ivd-utrecht.nl
Subject: vragen bij de behandeling van AVD11500201744

Geachte [REDACTED],

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een aantal vragen. Het betreft uw project: 'Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs' met aanvraagnummer AVD1150020171744.

Kunt u in de bijlage dierproeven de informatie onder punt L. volledig invullen?

In de bijlage dierproeven beschrijft u onder punt B, [REDACTED]. Kunt u de relevantie van deze opmerking toelichten in relatie tot de aangevraagde dierproeven of deze verwijderen?

Hoe gaat u om met het inzetten van beide geslachten dieren voor dit project? U beschrijft nu: mannen OF vrouwen.

Is in silico modelling voordat de PK studies worden ingezet een onderdeel van uw projectstrategie?

Uw aanvraag zal op 2 juni door de CCD in de vergadering besproken worden, het zou fijn zijn als we uw antwoorden dan hebben ontvangen,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Namens **Centrale Commissie Dierproeven**
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

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

Denk s.v.p aan het milieu voor u deze e-mail afdrukt.

This message may contain confidential information and is intended exclusively for the addressee. If you receive this message unintentionally, please do not use the contents but notify the sender immediately by return e-mail. University Medical Center Utrecht is a legal person by public law and is registered at the Chamber of Commerce for Midden-Nederland under no. 30244197.

Please consider the environment before printing this e-mail.



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'.	11500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Bioavailability of synerkines

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 aim of these experiments is to assess the bioavailability of ██████████ synerkines in rats. The primary outcome parameter will be concentration of synerkine and individual cytokines measured in rat plasma.

The bioavailability of synerkines will be compared to the bioavailability of the individual cytokines. ██████████ synerkine ██████████ will be injected in wild type rats using different routes. At different time points after injection, blood will be withdrawn, plasma or serum will be isolated and the concentration of the synerkine or cytokines will be measured. The pore size of the filtration barrier in the kidneys of humans and rats is compatible, therefore the bioavailability of synerkines in rats can be used to predict their behavior in humans. However, bioavailability may also be influenced by ██████████, and the contribution of this to the clearance pattern depends on how strongly ██████████ synerkines bind to the ██████████. To test the involvement of receptors that are involved in clearance of synerkines ██████████, some animals will be pre-treated with agents that ██████████

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

Blood withdrawal to collect pre-sample, injection of pre-treatment (optional). Injection of ██████████ synerkines ██████████ or individual cytokines (subcutaneous, intravenous, intraperitoneal, intrathecal, intra-articular). Blood withdrawal (max 150ul / time point) will be carried out at different time points, but in total max 8 times. Three rats will be used per time point. Alternated rats will be used to avoid too frequent blood withdrawal. The maximal amount of blood withdrawn will always remain below 8mL/kg in a period of 2 weeks. At the end of the experiment rats will be euthanized and

organs will be removed for analysis of the biodistribution of synerkines.

Depending on the plasma half-life of the synerkine the time points for blood withdrawal vary. For example the optimal time points to determine the plasma half-life of synerkines with a [REDACTED] would be 5', 10', 15', 20', 30', 1h and 2h. For such short term experiments (less than 2 hours) involving repeated blood withdrawal, rats will be anesthetized with 2.5% isoflurane and the tail vein will be cannulated (using Abocath).

To study the bioavailability of synerkines [REDACTED], rats will be followed for a longer period (up to 4 weeks) and blood will be collected. In case of less frequent sampling time points we will consider using a recently described blood withdrawal technique (using a "vlindernaald", see link below). <http://www.ivd-utrecht.nl/nl/goede-voorbeelden/bloedafnametechniek-verfijnt-dierproef-rat/#%20Bloedafnametechniek%20verfijnt%20dierproef%20rat>.

The optimal time points for blood withdrawal for [REDACTED] synerkine will be determined in pilot experiments. Usually the distribution of proteins is characterised by a distribution phase ($t_{1/2\alpha}$) and an elimination phase ($t_{1/2\beta}$). Based on the pilot experiments for [REDACTED] synerkine we will adjust blood withdrawal in the subsequent experiments so that sufficient sampling time points will fall in the expected phases enabling accurate determination of these values.

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

Statistical analysis is generally not used in PK studies. After each experiment we will critically evaluate the variation, the optimal time points for blood withdrawal and the group sizes in order to gather meaningful results with the least amount of rats possible. Previous experiments using IL4-10 synerkine suggest that at least three animals per time point is needed for reliable results.

B. The animals

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

Wistar Crl:WI rats (male or female) obtained from Charles River (or other registered commercial breeder within the EU) will be used. Either males or females only will be used for a single experiment to reduce variation. Adult rats will be used (between 8 and 20 weeks). Three rats will be bled per time point, so at least 6 animals will be used per group, this is based on our previous experience. Rats are generally accepted as models for PK studies in humans. The reason for this is that the rats are large enough for repeated blood withdrawal and the biodistribution of most drugs in rats accurately predicts their characteristics in humans.

We plan to test [REDACTED] synerkines: IL4-10 [REDACTED] synerkines. [REDACTED] synerkine [REDACTED].

The approximate design of a typical series of experiments for one synerkine would look as follows.

Experiment 1

Aim

To test improved bioavailability of IL4-10 compared to individual cytokines after i.v. injection.

Setup

Group A: recombinant IL-4

Group B: recombinant IL-10

Group C: IL4-10 (dose 1)

Group D: IL4-10 (dose 2)

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

Expected outcomes

→ Improved bioavailability by synerkine compared to individual cytokines.

→ Optimal dose and sampling time points will be determined.

Experiment 2

Aim

To test bioavailability of [REDACTED] and bioavailability after s.c. injection.

Setup

Group A: IL4-10 i.v.

Group B: IL4-10 [REDACTED]

Group C: IL4-10 [REDACTED]

Group D: IL4-10 s.c.

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

Expected outcomes

→ Detection of altered bioavailability by [REDACTED] synerkines [REDACTED] synerkine.

→ Bioavailability after s.c. injection.

Experiment 3

Aim

To provide evidence for [REDACTED] clearance rates. [REDACTED] that thought to be involved in clearance of synerkines [REDACTED] before the experiment (pre-treatment).

Setup

Group A: IL4-10 ([REDACTED]) i.v.

Group B: IL4-10 ([REDACTED]) i.v. + pretreatment

Group C: IL4-10 ([REDACTED]) i.v.

Group D: IL4-10 ([REDACTED]) i.v. + pretreatment

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

Expected outcomes

→ The mechanism underlying [REDACTED] bioavailability by [REDACTED] synerkines is unravelled.

Experiments 4-7

Additional experiments using altered time points for blood withdrawal, different route of administration, different dose, using [REDACTED]. Based on the outcome of experiments 1-3, we will consult with the IvD about the exact design of these follow up experiments and these will be described in detail in the work protocol.

We would like to stress that we do not expect that for [REDACTED] synerkine [REDACTED] after each experiment it will be evaluated whether further studies are necessary. [REDACTED]

[REDACTED] synerkine [REDACTED]

We expect that we will perform maximal 8 experiments per year (192 rats per year).

Therefore we expect that we will use maximally 960 rats in the coming 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.

Can we reuse animals?

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 bioavailability of macromolecules is influenced by a wide range of factors, including but not limited to size of the molecule, charge, [REDACTED] etc. Therefore it is not possible to accurately predict the behaviour of [REDACTED] synerkines *in vivo* based on only *in vitro* studies. We will perform extensive analysis *in vitro* on [REDACTED] synerkine before proceeding to the *in vivo* experiments. To be able to perform human studies a clean synerkine batch

should be produced which is out of scope of the current study.

Reduction: Based on our previous experience we expect that three animals per time point is sufficient to obtain reliable results. Nevertheless, after each experiment we will evaluate the group sizes. We will also critically look at the data and in case of no improvement by ■ synerkine ■ compared to the individual cytokines the experiment will not be repeated.

Refinement: The pharmacokinetics of proteins in rats is well accepted and yield relatively robust data. All experiments will be carried out by experienced technicians or researchers.

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

Animals will be kept in groups wherever possible. For short term experiment, animals will be anesthetized during the entire experiment. All handlings will be performed by experienced animal technicians or researchers.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

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.

For short term experiments (less than 2 hours) involving repeated blood withdrawal, rats will be anesthetized with 2.5% isoflurane and the tail vein will be cannulated (using Abocath).

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We do not expect any adverse effect on the animals' welfare based on some limited previous experiments.

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

It is not likely but we cannot rule out that in studies after the injection of synerkines antibodies are formed against the synerkines, which upon repeated injection may cause anaphylactic reaction. We will assess the generation of antibodies after single injection. When repeated injection of synerkines will be applied, animals will be carefully monitored for signs of anaphylaxis (e.g. fast breathing). Such reaction will be considered a humane end point.

Indicate the likely incidence.

Less than 5%.

K. Classification of severity of procedures

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

Injection of synerkines represents mild discomfort. Repeated blood withdrawal represents mild discomfort. We expect that most animals (80%) will experience mild discomfort despite the combination of procedures. In the rest of the rats, e.g. when pretreatment will be applied or when animals are bled for the assessment of antibody titers, the cumulative discomfort may be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

We will collect tissues at the end of the experiment. In addition, after rats are injected with synerkines they could develop neutralizing antibodies against the individual cytokines or the linker sequence of which ■ synerkine is composed. Such antibodies could interfere with the outcome of a second study, that is the reason animals cannot be reused.

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

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1150020171744
Bijlagen
1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 16 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs" met aanvraagnummer AVD1150020171744. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 mei 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u een aantal vragen gesteld over de experimentele opzet. U heeft bijlage dierproeven 3.4.4.1 aangepast.

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 "Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juli 2017 tot en met 30 juni 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een vergunning niet langer kan zijn dan 5 jaar.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 mei 2017. 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 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:
6 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020171744

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs" met aanvraagnummer AVD1150020171744, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Senior Scientist.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 mei 2017, ontvangen op 16 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 mei 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Bioavailability of synerkines				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	960	20% Matig 80% Licht	

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.

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

Aanvraagnummer:
AVD1150020171744

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:

AVD1150020171744

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:
AVD1150020171744

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 W17-11										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20171824	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	Projectvoorstel				x	x	x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x		x		
5	DEC-advies				x		x			
6	Ontvangstbevestiging				x		x			
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
8	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x			
9	NTS aangepast	x								
10	Adviesnota CCD		x						x	
11	Beschikking en vergunning				x		x			

1824

23 MEI 2017



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	10500
		<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	Rijksuniversiteit Groningen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	1179037
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	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
		Postbus	
		Postcode en plaats	9713 AV Groningen
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	PhD kandidaat
		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	Universitair docent
		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 | 15 - 06 - 2017 |
| Einddatum | 15 - 06 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het effect van preeclampsie op de gezondheid van moeder en kind op lange termijn
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------------|
| Naam DEC | DEC-RuG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning €1035 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- 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 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 Groningen

Datum 22 - 05 - 2017

Handtekening 



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Het effect van pre-eclampsie op de gezondheid van moeder en kind op lange termijn in muizen
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Pre-eclampsie; foetale programmering; stofwisseling; cardiovasculaire gezondheid

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Het doel van dit project is om te achterhalen wat de langetermijngevolgen van pre-eclampsie zijn voor moeder en nageslacht. Pre-eclampsie, ook wel zwangerschapsvergiftiging genoemd, is een gevaarlijke aandoening. Klinische symptomen zijn een hoge bloeddruk en eiwitten in de urine. De oorzaak is niet bekend. Wel is bekend dat de werking van de placenta verminderd is, waardoor de foetus minder voedingsstoffen binnen krijgt en vaak groeivertraging oploopt.</p> <p>Uit epidemiologische studies is bekend dat kinderen die als foetus zijn blootgesteld aan pre-eclampsie later een verhoogd risico hebben op hart- en</p>
---	---

vaatziekten en problemen met de stofwisseling. Hoe dat precies komt, is niet duidelijk, maar het is heel goed mogelijk dat deze kinderen 'foetaal geprogrammeerd' worden voor een leven met weinig voedingsstoffen. Vervolgens kunnen ze de grote hoeveelheden vet, suiker en calorieën die er in onze westerse wereld beschikbaar zijn, niet verwerken.

Ook is bekend dat de moeder een verhoogd risico loopt op hart- en vaatproblemen na een zwangerschap met pre-eclampsie.

Pre-eclampsie is een ziekte die alleen spontaan voorkomt bij mensen. In proefdieren kunnen de symptomen op verschillende manieren nagebootst worden, maar geen van deze manieren leidt tot een 100% imitatie van humane pre-eclampsie.

In dit onderzoek willen we eerst vier verschillende diermodellen voor pre-eclampsie met elkaar vergelijken. Dit zal ons inzicht geven in de overeenkomsten en verschillen tussen de modellen onderling en tussen de diermodellen en humane pre-eclampsie.

Daarna volgen twee studies naar langetermijneffecten. In de eerste geven we het nageslacht verschillende diëten die relevant zijn voor onze eigen leefomgeving, zoals een dieet hoog in vet of suiker. De verwachting is dat dit leidt tot problemen met de stofwisseling, zoals diabetes. In de tweede zullen we nadelige gezondheidseffecten voor het nageslacht proberen te beperken door het dieet van de moeder aan te vullen met voedingssupplementen.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Met een diermodel is het mogelijk om tot op moleculair niveau te analyseren wat de langetermijneffecten op de gezondheid van moeder en kind zijn. Dit is de hoofdopbrengst van deze studie.

Daarnaast is de uitgebreide karakterisatie en vergelijking van vier verschillende muismodellen nuttig voor vele vervolgonderzoeken.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Muizen. Het verwachte totale aantal is 2006, waarvan 363 vrouwtjes, 35 mannetjes en 1608 pups.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

In alle studies zal in de moeders pre-eclampsie opgewekt worden. In onze huidige studie lijken de moeders van de symptomen van pre-eclampsie zelf geen ongerief te ervaren.

In de eerste studie moeten de moeders voor het verzamelen van urine één dag in een kooi verblijven met een rooster als ondergrond. De pups worden aan het einde van de zwangerschap geëuthanaseerd.

In de langetermijnstudies zullen de moeders tijdens de zwangerschap voedingssupplementen of medicatie toegediend krijgen en daarna een dieet dat bijvoorbeeld hoog is in zout of vet. Het is niet waarschijnlijk dat deze diëten ongerief veroorzaken. Het nageslacht krijgt na de spening een dieet dat bijvoorbeeld hoog is in vet of suiker. Om hun gezondheid gedurende lange tijd (maximaal 6 maanden) te karakteriseren is een aantal testen en bloedafname nodig. Soms zal individuele huisvesting tijdelijk nodig zijn.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het

Tijdens deze studies is het ongerief voor de moeders ingeschaald als 'matig' en dat voor het nageslacht als 'licht'.

project ingedeeld naar de verwachte ernst?

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De moeders en het nageslacht worden geëuthanaseerd om bloed en organen te analyseren. De mannetjes kunnen gebruikt worden voor andere onderzoeken of onderwijs.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Foetale programmering is het resultaat van een complexe interactie tussen moeder en foetus via de placenta. Dit kan op dit moment nog niet nagebootst worden.

4.2 **Vermindering**

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

Het ervaren van stress kan een grote variatie tussen individuen opleveren. Door stress te minimaliseren wordt deze variatie beperkt, waardoor minder dieren nodig zijn.

We zullen verscheidene experimenten tegelijk uitvoeren, zodat maar één controlegroep nodig is voor alle groepen.

We vragen 50% extra vrouwtjes aan om de muizen te vervangen die niet zwanger worden of die een extreem groot of klein nest krijgen. Als het niet nodig is, zullen we deze vrouwtjes niet gebruiken.

4.3 **Verfijning**

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

Waar mogelijk is bij het ontwerpen van onze studies de minst stressvolle optie gekozen. Een voorbeeld is de duur van de langetermijnstudie. Er staan testen gepland als de muizen 3 en 6 maanden oud zijn, maar als daar na 3 maanden geen reden toe is, zullen we de studie niet voortzetten.

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

De muizen worden constant gemonitord op overmatig gewichtsverlies en onnatuurlijk gedrag. Bij overmatige stress en angst wordt het dier geëuthanaseerd om verder ongerief te voorkomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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.

Preeclampsia (PE) is a common complication during pregnancy, affecting 2-8% of all pregnancies. Clinically, it is characterized by maternal hypertension and proteinuria and often complicated by fetal growth restriction. The exact chain of events leading to PE is unclear. A main current hypothesis is that

the cause of PE is disturbed development of the placenta, by dysfunctional cytotrophoblast migration and invasion into the uterus, which leads to placental ischemia. Because of this ischemia, placental signalling factors are released into the mother's blood stream. Those factors include sFlt1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1; anti-angiogenic), sENG (soluble endoglin; anti-angiogenic) TNF- α (tumor necrosis factor alpha; pro-inflammatory) and AT1-AA (angiotensin II type I receptor autoantibodies; reduces NO levels, induces vasoconstriction and reactive oxygen species) (Spradley et al. 2015). Together, these factors cause endothelial dysfunction and thereby hypertension. Currently, there is no cure to PE other than delivery of the baby and placenta.

Research in human patients and their offspring has shown that PE poses a threat to both short-term and long-term maternal and fetal health (Steeegers et al. 2010; Stojanovska et al. 2016). This project will focus on unravelling the molecular long-term consequences of PE on maternal and fetal health and on possible interventions.

Placental nutrient transport in PE - One of the main characteristics of PE is disturbed development of the placenta. Because of disturbed placentation, the offspring of preeclamptic mothers is challenged with a disturbed nutrient supply. This leads to compensatory mechanisms in the fetus, which sometimes achieve normal growth. More often, however, PE leads to intra-uterine growth restriction of the fetus (IUGR), which is a well-known risk factor for the development of metabolic syndrome later in life (Rando & Simmons 2015). Besides exposure to maternal high blood pressure and nutrient restriction, levels of several circulation factors, including reactive oxygen species, leptin, pro-inflammatory (TNF- α) and anti-angiogenic (sFlt1, sEng) factors, are found increased not only in the preeclamptic woman, but also in the cord blood of her child. Exposure to this wide range of alterations during development is likely to influence long-term programming of offspring's health after PE.

Long-term consequences - Thus, in PE, a combination of fetal undernutrition (by placental dysfunction), maternal hypertension and aberrant circulating factors in cord blood poses a special risk to the offspring. At school age, children exposed to PE have a higher blood pressure and heart rate, smaller hearts and other features of cardiac diastolic dysfunction. In the first five years of their lives, children exposed to PE are more often hospitalized for endocrine and metabolic diseases than non-exposed children, and in adolescence, BMI is higher in exposed males. Furthermore, PE exposure combined with insulin resistance is a strong predictor for the metabolic syndrome in school-age children (reviewed by Stojanovska et al, 2016). Concerning the mechanisms and determining factors involved in this programming of long-term health by PE, little is known. Cellular adaptations and epigenetic changes are likely to be important consequences of PE that can program long-term health. At the moment, interventions or a personal dietary advice for mothers and offspring exposed to PE are not possible.

Concerning the long-term health consequences for the mother, it is known that gestational hypertension and PE are associated with an increased risk for cardiovascular diseases (including chronic hypertension, ischemic heart disease and cerebrovascular accidents) later in life (Steeegers et al. 2010). Again, little is known about mechanisms and determining factors. It is not known if these women are at risk for cardiovascular diseases because of the events during PE or because of pre-existing factors that are involved in the onset of PE.

Obesity - Living in this westernized world, where obesity is common, poses another risk for direct and long-term consequences of PE. Prepregnancy obesity is a well-known risk factor for PE and is known to exaggerate both the PE phenotype in the dam and long-term metabolic consequences for the offspring (Bytautiene et al. 2011).

Prevention - For long-term fetal outcome, the main problem seems to be the limited placental transport capacity in PE. Ideally, one would aim to use the remaining capacity as efficient as possible for the transport of the most important nutrients. During pregnancy, supplementing the dietary factors that are scarce in the PE-exposed fetus or the factors that counteract on those too abundantly available in the dam and fetus are possibly beneficial for long-term health. Based on literature, candidates for supplementation are [REDACTED]

Furthermore, since DNA methylation changes are found in IUGR offspring, supplementing the one-carbon

pathway, which provides metabolites for DNA methylation, can show if this programming is a well-regulated adaptation to the changed environment *in utero*, or a maladaptation caused by shortage of nutrients because of placental insufficiency. It is already shown that this kind of supplementation abrogates metabolic consequences of IUGR in rats (Goodspeed et al. 2015).

PE animal models – Since PE is a pregnancy complication with unknown etiology, which only develops spontaneously in humans and higher primates, a perfect animal model does not exist yet. Opportunities for inducing PE in animals are in mimicking the clinical symptoms, which can be done in several ways.

Another promising model for PE is described by [redacted], where inhibition of [redacted] and thereby in an increase in blood pressure and proteinuria and a decrease in placental and fetal weight [redacted]. Furthermore, [redacted] are promising in modelling PE symptoms in animals. [redacted] are mediating the release of [redacted] and increased blood pressure [redacted]. And lastly, a murine knock-out model of the transcription factor Tfp2c leads to placental insufficiency and IUGR [redacted] however, the consequences for maternal blood pressure and proteinuria are not yet known. Since all of these models target different pathways in PE, an extensive comparison of the models is necessary to determine which model is best for translational studies.

Gains of this project – Most importantly, this study will shed light on the mechanisms playing a role in mediating the long-term health risk for children and mothers exposed to preeclampsia. By using an animal model, we are able to analyse molecular (gene expression and epigenetic) changes in several organs. In general, this study will give us fundamental insight into fetal programming. By testing consequences of and interventions to this extreme *in utero* situation, developmental mechanisms and fetal pathways that are vulnerable for fetal programming can be determined. This will lead to a better knowledge of which conditions during early life are ideal with respect to long-term health, also in uncomplicated pregnancies. Finally, our extensive comparison of animal models for preeclampsia will be useful for many future translational studies.

References

- [redacted]
- Bytautiene, E. et al., 2011. Prepregnancy obesity and sFlt1-induced preeclampsia in mice: developmental programming model of metabolic syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 204, p.398.e1-8.
- Goodspeed, D. et al., 2015. Essential nutrient supplementation prevents heritable metabolic disease in multigenerational intrauterine growth-restricted rats. *FASEB Journal*, 29, pp.807-819.
- [redacted]
- Paauw, N.D. et al., 2017. Pregnancy as a critical window for blood pressure regulation in mother and child: Programming and reprogramming. *Acta Physiologica*, 219(1), pp.241-259.
- Rando, O.J. & Simmons, R.A., 2015. I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism. *Cell*, 161(1), pp.93-105.
- Spradley, F.T., Palei, A.C. & Granger, J.P., 2015. Increased risk for the development of preeclampsia in obese pregnancies: weighing in on the mechanisms. *Am J physiol regul integr comp physiol*, 309, pp.R1326-R1343.
- Steegers, E.A.P. et al., 2010. Pre-eclampsia. *The Lancet*, 376(376), pp.631-644.
- Stojanovska, V., Scherjon, S.A. & Plösch, T., 2016. Preeclampsia as modulator of offspring health. *Biology of Reproduction*, 94(3), pp.1-33.
- [redacted]

3.2 Purpose

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

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

The main goal of this research is to unravel the long-term molecular consequences of preeclampsia for both mother and offspring in a mouse model. To that end, we have three sub-goals:

1. to characterize and compare four different mouse models of PE, all representing different facets of the disease.
2. to examine the long-term consequences of PE on maternal and offspring health, while both offspring and mother are placed on a diet relevant for this western world.
3. to examine possible interventions that can prevent the adverse programming of later-life health during pregnancy.

Achievability: from epidemiological studies, it is known that long-term health of offspring and dams is affected during PE, but to which extent and what the mechanisms are is not known yet. In mice with little intra-individual variability, most confounding factors are ruled out, which makes it possible to examine the precise consequences and the mechanisms playing a role. The use of animals makes it possible to take out and examine different organs. C57BL/6 mice are the perfect organism to study this question, because they are able to develop metabolic problems in a relatively short time span. Our pilot study already showed that we are able to mimic at least a part of the symptoms of clinical PE in mice with [REDACTED]. The [REDACTED] are used by other groups, but not fully characterized for PE yet. Placentas of the [REDACTED] are known to have a compromised junctional zone, which is also seen in PE, but this model is not characterized for PE yet.

3.3 Relevance

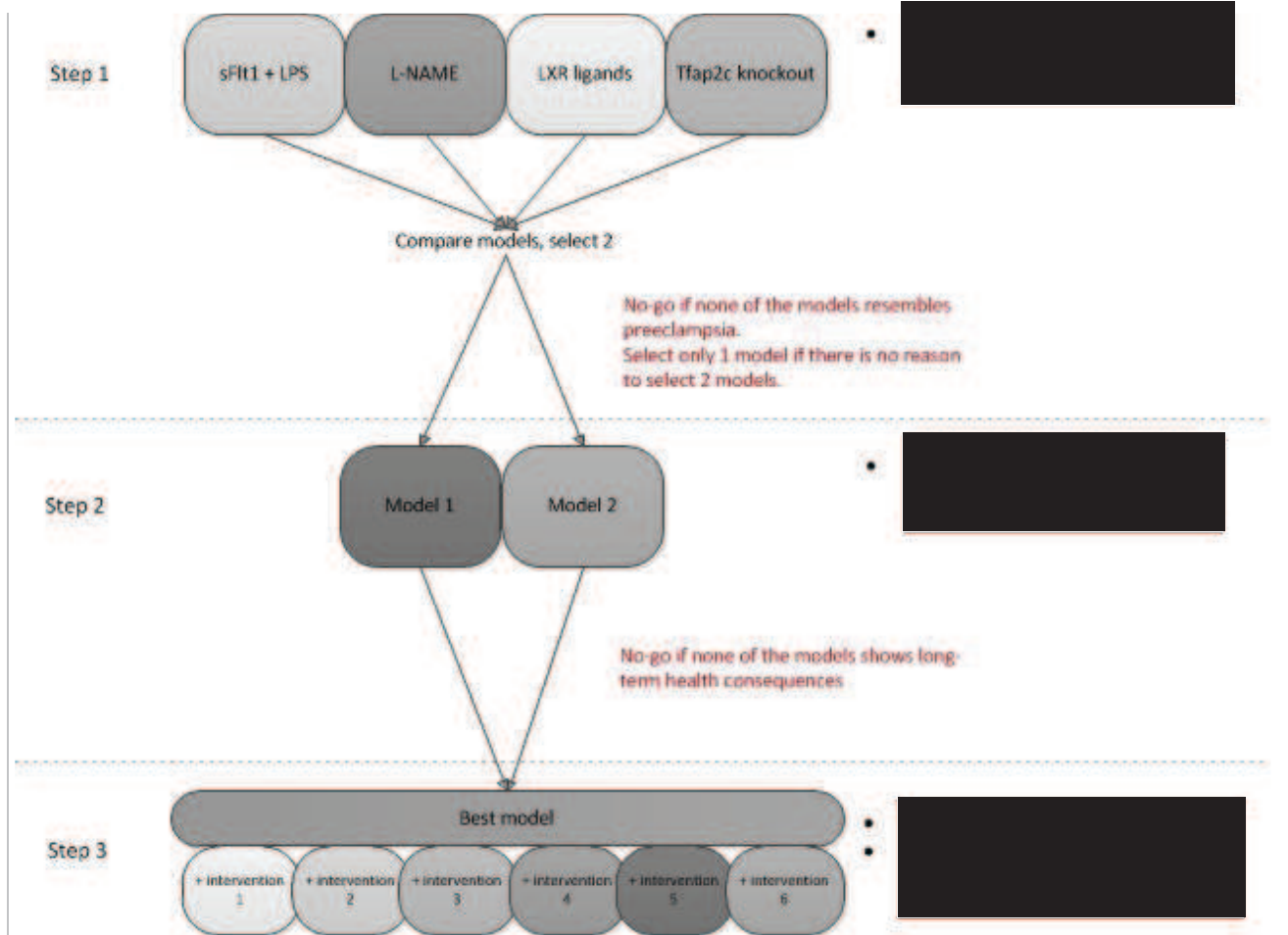
What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

2-8% of all pregnancies are complicated by preeclampsia and about 10% is complicated by placental insufficiency and IUGR (Paauw et al. 2017; Steegers et al. 2010). These complications are known to be a risk factor for metabolic syndrome and cardiovascular diseases in the offspring, which are the biggest health challenges of this era. Therefore, unravelling the role of intrauterine programming on gene expression and epigenetics in these diseases can help to fight these two very common categories of diseases.

Current therapies for hypertension and metabolic syndrome are initiated when the first signs of these diseases appear. However, if individuals at risk could be determined before these diseases show up, specific dietary advices or medication could be given to prevent the onset of these diseases, which would increase the quality of life of these individuals. PE and gestational hypertension lead to an increased risk of (gestational) hypertension and PE in the offspring and thus passes the risk of cardiovascular diseases through generations (Paauw et al. 2017). Ideally, this adverse fetal programming should be prevented, which would give more equal health chances to everyone.

3.4 Research strategy

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



In step 1, we will characterize and compare 4 promising preeclampsia-models. The main focus will be on the clinical symptoms and molecular changes during PE in the dam. If necessary, optimization will take place. Based on the outcome of step 1, we will choose the 2 most relevant models for step 2, which is a long-term follow up of the dam and her offspring. If there is no relevant or only 1 relevant model found in step 1, we will not continue with step 2 or we will only continue with 1 model. Finally, in step 3 we will test interventions in one of the long-term models of step 2. For this study, we will choose the model that is most relevant to the clinical situation.

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.

First, a proper model of preeclampsia is needed. In our pilot study we tested [REDACTED]. This study is still ongoing, but the results so far are promising. The dams show significantly elevated blood pressure and the pups are growth restricted, which both are major clinical symptoms in human PE. Since PE is a complex disease with many molecular characteristics of unknown etiology, all animal models for PE are mimicking only a part of the molecular consequences of PE in humans. Thus, only using one model does not give a clear answer to the question whether or not the outcome for mother and offspring is relevant for humans. So, because there is no model completely resembling clinical PE, we would like to use four different models. The outcome of several models together can indicate whether consequences found are related to PE in general, or only to the specific molecular changes in one model. On the one hand, this will strengthen the translation of our study to the human situation, and, on the other hand, this will give us mechanistic insight in which molecular changes are relevant for programming and which are not. Furthermore, this comparison of several models gives us the chance to select the most clinically relevant model(s) for further studies.

So, the first step in this research will be a systematic comparison of four different animal models for PE. If the results of this comparison give reasons to do so, optimization of the models will take place and

dams will be challenged with prepregnancy obesity. In this first step, terminal experiments to measure blood pressure will take place at gestational day 18, one day before estimated delivery. At this time point, blood and tissues of the mother and the offspring will be collected and analysed.

Second, long-term consequences of preeclampsia on offspring's health will be determined in 2 different mouse models. Based on the results of step 1, we will choose the two models best resembling human maternal and fetal pathology. Main parameters for choosing a model will be proteinuria, blood pressure and blood analysis (e.g. for inflammatory and angiogenic status) of the dam, weight of the fetuses and placental morphology. In this experiment, the offspring will be delivered and will age before termination.

. Before termination, metabolic tests will be performed. Organs and blood will be collected and analysed. The 2 different models should both be relevant for clinical PE and there should be differences between the models. If none of the models from step 1 is relevant for clinical PE, we will not perform this study. If only 1 of the models is relevant, or if all the relevant models show exactly the same phenotype, we will perform this study in 1 model. The similarities and differences between the 2 models will on the one hand increase the translatability of the results, and on the other hand give mechanistic insights in determining factors for programming of long-term health.

Third, once the model and its long-term consequences on offspring health are determined, interventions will be tested in the one model giving the most clinically relevant programming results. Most interventions aim to program the offspring for a healthier life later on, but prepregnancy obesity will be included as a 'negative intervention', because of its societal relevance.

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

The three steps described will take place sequentially, and the results of the previous step are necessary for continuing to the next step. Therefore, if the results of the previous step give no scientific reason to continue, we will not proceed. So, for instance, if we establish only 1 mouse model for PE in step 1, we will continue with that one only in step 2, and if there is no adverse programming effect found in dam nor offspring in step two, we will not proceed to the testing of interventions in step 3. The main outcome parameters for a successful model of PE will be maternal blood pressure, maternal proteinuria and fetal weight. The main outcome parameters for programming of long-term consequences in both dam and offspring will be body weight and composition, blood pressure and metabolic parameters, with associated gene expression and epigenetics.

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	Preeclampsia and long-term programming of health
2	
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'.	10500				
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen				
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Serial number</th> <th style="width: 50%;">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td>Preeclampsia and long-term programming of health</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Preeclampsia and long-term programming of health
Serial number	Type of animal procedure				
1	Preeclampsia and long-term programming of health				

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.

Step 1: Comparison of animal models for preeclampsia

In humans, preeclampsia (PE) is characterized by elevated blood pressure and proteinuria. Furthermore, offspring is often growth restricted and levels of reactive oxygen species, cytokines, anti-angiogenic factors, angiotensin 1 agonistic autoantibodies and leptin are found increased in the maternal circulation. In this step, four animal models for PE will be systematically compared:

1. [Redacted]

Primary outcome parameters will be maternal blood pressure and proteinuria and fetal and placental weight, since those are the clinically relevant parameters also found for humans. Since aortic blood pressure measurement is a terminal experiment and several tissues need to be collected, termination will take place at gestational day 18, right before the estimated delivery at gestational day 19. Collection of the pups and placentas from the uterus is necessary, firstly because the dam will eat the placentas and resorptions right after birth, and secondly because we need to register the location of each pup in the uterus, since this may influence programming. Male and female offspring will be analyzed separately. Collecting a large blood sample and all kinds of tissues, including heart, liver and brain, of the dam and

her fetuses at gestational day 18 will give us the opportunity to compare the short-term molecular consequences in these tissues to the long-term molecular consequences in step 2 and 3. The main analyses will be for circulating factors, proteinuria, morphology and gene expression of the placenta and gene expression and epigenetic marks in the tissues. This close biochemical and physiological comparison of these four models might show that an additional experiment is necessary to optimize or combine them. If this optimization-step takes place, we will also challenge the dams that are subjected to the most promising PE model with prepregnancy obesity.

Step 2: Long-term consequences of preeclampsia on offspring's health

In this step, the long-term consequences of PE on dam and offspring's health will be determined. To that end, we will use two models of step 1 that show a phenotype comparable to clinical PE. This decision will be based on the primary outcome parameters of step 1. Because the etiology of PE is unknown, spontaneous development of PE in mice is not possible. The several models mentioned in step 1 all target a different mechanism involved in PE. The use of 2 models targeting a different PE mechanism will have a lot of added value for this study. It will give us insight in whether observed consequences are specific to one model, or to PE in general. Furthermore, it will give us insight in the mechanisms playing a role in programming and it will make this study better translational to humans. Two different models will only be used if there are 2 clinically relevant models found in step 1. The relevance of a model will be assessed based on the primary outcome parameters of step 1 (blood pressure, proteinuria, circulating factors and fetal and placental weight). However, to have added value, the characteristics of the 2 models should not be exactly the same. In case more than 2 clinically relevant models are found, we will choose the 2 models that show the widest range of the clinical PE spectrum as possible. If there is only 1 clinically relevant model found in step 1, or if all the clinically relevant models show the same characteristics, we will only use one model in this step. If there are no relevant models found in step 1, step 2 and 3 will not take place.

After being exposed to PE, offspring will be kept for a maximum of 6 months. [REDACTED]

[REDACTED]. Primary outcomes for the offspring will be metabolic data, blood pressure and body composition, since these factors seem to be affected in the clinical situation. Furthermore, histological, epigenetic and gene expression analysis in several organs will give insight in the mechanisms playing a role. Metabolic data will be gathered at both 3 and 6 months of age. If the phenotype is strong and present at 3 months of age, the experiment can be stopped earlier.

After weaning, the dam will be kept up to 3 months to examine long-term consequences. [REDACTED]

[REDACTED]. Primary outcome parameters for the dam will be blood pressure, proteinuria and analysis of heart, liver, kidney and blood, since these parameters are most likely to be affected by PE.

Step 3: Test interventions to influence adverse fetal programming during PE

If programming of offspring's health by PE is found in step 2, interventions to influence adverse fetal programming will be tested. We will use the animal model from step 2 that showed the most clinically relevant programming effect. This choice will be based on analysis of blood, tissues and metabolism. If only one model is examined in step 2, that model will be used. If there is no programming-effect found in step 2, step 3 will not take place. Different interventions will, as an example, aim to improve the nutrient availability *in utero* or maternal status, leading to less fetal exposure to PE factors. For improving *in utero* conditions, dietary supplementation of several key nutrients, [REDACTED]

[REDACTED] will be tested. These dietary supplements and drugs are likely to have a positive effect on offspring's health. We will also include prepregnancy obesity as a 'negative intervention', because of its relevance for this westernized world.

Experimental setup and outcome parameters will be comparable to step 2.

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

Step 1: Comparison of animal models for preeclampsia

Procedures:

- Dam:
 - o vaginal smears: to determine the stage of the oestrus cycle
 - o induction of prepregnancy obesity with a dietary intervention
 - o overnight mating: since the induction of PE needs to happen at specified gestational days, mating will take place overnight.
 - o induction of PE: method differs per group
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - The use of a combination of these techniques in one group is also possible.
 - o blood sampling at one time point around mid-gestation to determine the level of [REDACTED] and other circulating factors.
 - o metabolic cage: to measure the level of proteinuria at the end of gestation, pregnant mice need to be in a metabolic cage for 24 hours to collect urine.
 - o blood pressure measurements using a tail cuff system. This involves short-term restraint of the mice. Mice will be trained for this procedure before onset of pregnancy, to reduce the level of stress during the relevant measurements during pregnancy. However, stress will still be a big confounder in this measurement. The most reliable and practical blood pressure measurement in mice is with a catheter in the abdominal aorta, but since this is a terminal experiment, this can only be done once. In this step, we will compare the blood pressures obtained with both methods. If they correlate, the tail cuff method can be used in the long-term experiments in step 2 and 3, since terminal aortic blood pressure measurement is not possible there during gestation.
 - o terminal blood pressure measurement: at gestational day 18, blood pressure will be measured by placing a catheter in the abdominal aorta, under anaesthesia, followed by urine collection and termination by cardiac puncture and cervical dislocation.
- Offspring:
 - o Termination by decapitation at gestational day 18.

Step 2: Long-term consequences of preeclampsia on dam and offspring health

Procedures:

- Dam:
 - o overnight mating
 - o induction of PE
 - o blood sampling around mid-gestation
 - o [REDACTED]
 - o tail cuff blood pressure measurement
 - o metabolic cage (in non-pregnant state)
 - o Ear punch for identification: necessary for group housing
 - o terminal aortic blood pressure measurement at a maximum of 3 months after weaning
- Offspring:
 - o Ear punch for identification: necessary for group housing
 - o [REDACTED]
 - o [REDACTED]
 - o feces collection: for collection of feces from the bedding, temporary individual housing is

- necessary.
- Body composition measurement: a non-invasive and quick method to analyze body composition. This procedure will be performed a maximum of 4 times.
 - glucose-, insulin- and pyruvate tolerance test: these tests give insight in the glucose metabolism of the animals. The mice will be fasted for <16 hours (exact time necessary differs per test; drinking water available *ad libitum*; extra bedding material provided for body heat preservation) and given a bolus of insulin, glucose or pyruvate (intraperitoneal or gavage). Blood samples will be taken to follow the response over time. These tests will all be performed 2 times.
 - fasted blood sample. Mice will be fasted for 16 hours before a blood sample is taken. Water will always be available *ad libitum*. This will be done a maximum of 2 times, combined with the pyruvate tolerance test when possible.
 - administration of stable isotope-labelled acetate: will be performed if body composition, blood analysis or results of the tolerance tests give an indication to further study metabolism. Labelled acetate will be administered in drinking water and several blood samples will be taken, without exceeding the limit for blood sampling. This procedure will be performed a maximum of 1 time.
 - administration of a stable isotope-labelled metabolite: will only be performed if there is a good scientific reason to further study one metabolite. The metabolite (e.g. glucose) will be administered via oral gavage, intraperitoneal injection or intravenous injection. Several blood samples will be taken, without exceeding the limit for blood sampling. This procedure will be performed a maximum of 1 time.
 - regular blood sampling: will not exceed the maximum of 8 mg/kg body weight per 14 days.
 - NOTE: tolerance tests, labeled-isotope tests and (fasted) blood sampling will be planned well apart from each other (minimum 1 week), to allow the mice to recover and to stay within the maximum limits for blood sampling.
 - Terminal blood pressure measurement with an aortic catheter, followed by bladder puncture, cardiac puncture and cervical dislocation at a maximum of 6 months after weaning

Step 3: Test interventions to influence adverse fetal programming during PE

Procedures: The used procedures will be the same as in step 2, with the addition of interventions for the dams.

- Dam:

- dietary supplementation, [REDACTED]
[REDACTED] Dietary supplementation will be done by mixing the supplements into the food.
- oral drug administration, [REDACTED]. This will be administered in the food or drinking water preferably, but in some cases injections or oral gavage might be needed.
- induction of prepregnancy obesity with a dietary intervention

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

To determine the number of animals, power analyses are performed for the primary outcome parameters. A power of 80% and α of 0,05 are used for the calculations. For step 1, blood pressure is the most important and most variable parameter. Expected difference (8mmHg) and standard deviation (6 mmHg) were taken from the currently running study. This gives an n of 12 per group. For step 2 and 3, circulating factors and metabolic tests are the most variable, since gene expression and epigenetic measurements are very precise and robust. An important outcome measurement is the insulin tolerance test. Based on the difference (39) and standard deviation (26; average of both groups) found in 3-month old females, an n of 10 per group should be sufficient (McDonnold et al., 2014).

The number of mice is kept to a minimum by critical judgement of the relevance of several (control) groups. We will analyse multiple experimental groups with one control group at the same time, which reduces the number of control groups needed. Furthermore, mating will be done in different cohorts, starting sequentially. This offers the possibility to stop the experiments if the group size is sufficient without using the extra mice calculated. Finally, males will be re-used as long as they are in their fertile age.

Reference

McDonnold, M., Tamayo, E., Kechichian, T., Gamble, P., Longo, M., Hankins, G. D. V, ... Costantine, M. M. (2014). The effect of prenatal pravastatin treatment on altered fetal programming of postnatal growth and metabolic function in a preeclampsia-like murine model. *The American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 210, 542.e1-e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.01.010>

B. The animals

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

Species: experiments will be performed in mice, because of the experience with mice in our group, the possibility to compare our study to literature about programming, where mice are the major studied organism, and the possibility to compare our preeclampsia-results to earlier results and results from collaborators about intra-uterine growth restriction.

Origin: male and female C57BL6/J mice will be ordered from a licensed breeder. This strain is widely used in metabolic studies, which gives us the possibility to compare our results with literature. Pups delivered in the experiment will be own breeding. [REDACTED] mice and their controls will be obtained from a collaborator.

Life stages: females and males for mating will be obtained at breeding age. In step 1, termination of both dam and fetuses will take place at gestational day 18. In step 2 and 3, females will be used for one pregnancy and will be terminated at 3 months after weaning. Offspring will age until a maximum of 6 months after weaning.

Estimated numbers:

Step 1: 4 different models will be compared, and because 2 of these models will take place in the same place with a comparable procedure, only 3 control groups are required. This comparison of models can give rise to an additional optimization study for the 2 most promising models, of which one will then also be tested with prepregnancy obesity. 2 control groups will be necessary here, one without PE and without prepregnancy obesity and one without PE but with prepregnancy obesity. So, the maximum number of groups in this first step is 12.

Based on expected difference between the groups, a sufficient group size for finding significant differences is 12 dams per group. We apply for 50% extra, because of two reasons. Firstly, our experiences are that not all dams get pregnant, even not after a few rounds of mating. Secondly, we will exclude dams with an extremely small or large nest (<4 or >9 pups), since this will influence offspring metabolism. Based on our pilot study, we believe that 50% extra dams should be sufficient to counteract these two factors. Once the number of 12 dams in a group is reached, we will stop adding new mice to the group and the remaining dams will not be used for this experiment.

- females: 216 (12 groups * 12 per group + 50% reserve (10% for small/large litters + 40% for non-pregnant; 159 pregnant, 57 non-pregnant)
- males for mating: 15
- Offspring: 954 (159 dams with an average of 6 pups per dam)

Step 2:

We will examine the offspring of two PE models. It is dependent on the similarity between the used

models if we need 1 or 2 control groups. Males and females will be analyzed separately, since programming effects differ widely between the sexes. The offspring will be challenged with 3 different diets, of which one is the control diet.

Per PE model:

- Offspring in experiment: 144 (12 groups (+/- PE (2), males/females (2), +/- dietary challenge (3) * 10 per group)
- Dams: 36. (144 offspring / 6 offspring per dam = 24 dams needed to produce 144 offspring. As in step 1, a margin of 50% extra females will be used. $24 + 10\% = 27$ will get pregnant)
- Males: 5
- Offspring terminated after birth: 18 pups are expected to come from a litter <4 or >9 . (10% of all dams are expected to deliver such a litter. Thus $3 \text{ dams} * 6 \text{ offspring on average} = 18 \text{ pups}$)

Total of 2 PE models:

- Dams: 72 (54 pregnant, 18 non-pregnant)
- Males: 10
- Offspring in experiment: 288
- Offspring terminated at birth: 36

Step 3:

We will test 6 interventions. For logistic reasons, it is not possible to test all types of interventions simultaneously. Therefore, we will perform the study in two cohorts. Besides the intervention-groups, each cohort needs 2 control-groups, with PE and without PE. This gives a total of 10 groups of dams of which 2 groups are not exposed to PE. Since status of the offspring will be the main outcome, their desired number will be the main determinant for the number of dams. The offspring will not receive interventions or different diets. Males and females are separately analyzed, which gives a total of 20 ($10 * 2$) groups to analyze. Therefore, the number of offspring needed for the long-term study is 200 (20 groups * 10 per group).

The number of dams needed to produce 200 offspring is 33 ($200 / 6 \text{ pups per dam}$). However, this only gives us ($33 \text{ dams} / 10 \text{ groups} =$) 3 dams per condition, which might be too little to overcome the individual differences between the dams. We would like to use 5 dams per condition, which will give us a total of 50 dams. $50 + 50\% = 75 \text{ dams}$. To have 50 dams with a sufficient nest size, $50 + 10\% = 55 \text{ dams}$ have to get pregnant and deliver. They will deliver an estimation of ($55 * 6 =$) 330 offspring, of which 200 will continue in the experiment after weaning and 130 ($330 - 200$) will be terminated after birth or weaning. Of the mice terminated after weaning, tissues will be stored for analysis or primary cells will be isolated for *in vitro* experiments.

To summarize step 3:

- Dams: 75 (55 pregnant, 20 non-pregnant)
- Males: 10
- Offspring: 330 (200 in long-term experiment, 130 terminated after birth)

To summarize the whole project:

	Dams (not pregnant)	Dams (in experiment)	Males for mating	Offspring (terminated in fetal stage or 1 day after delivery)	Offspring (in long-term experiment)
Step 1	57	159	15	954	0
Step 2	18	54	10	36	288
Step 3	20	55	10	130	200

Total	95	268	35	1120	488
--------------	-----------	------------	-----------	-------------	------------

This gives a total of 2006 mice.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

The experiments for the dam and her offspring will be terminal, since blood pressure will be measured in the aorta and organs will be collected. The males will be used for mating only. We will use them repeatedly and afterwards they can be re-used by others.

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: Fetal programming of later-life health is a result of complex cross-talk between the mother, her fetus and many organs, which cannot be mimicked in a cell line or organoid yet. We do try to examine the impact of one specific factor on developing cells, but this does not resemble the complex embryogenesis. Since analysis of tissues of the offspring is necessary to unravel this mechanism, a human study would not be sufficient, and has as additional downside that many cofounders are present which cannot be controlled for. As mentioned in the proposal form, some human studies to long-term consequences of PE have been performed, but they are not conclusive yet, because of the downsides mentioned. Therefore, this animal study is necessary to determine long-term consequences, to examine the mechanisms involved and to test interventions.

Refinement: While designing the experiment, animal welfare was a major priority and unnecessary procedures are avoided. For instance, when the PE models are established in step 1, there is no need to subject the pregnant dams to a stay in the metabolic cage in step 2 and 3 anymore. For analysis of body composition, we will use a specialized body composition measurement machine instead of DEXA scanning, because the latter is more stressful. During the long-term study (step 2), regular monitoring of bodyweight and composition will take place and if there is no need to continue experiments, either because there is no scientific reason to do so or because the desired end points are already met, we will end them. During stressful procedures, such as intravenous injections, the mice will be anaesthetized for a short time. Of course, all procedures will be performed by experienced and trained individuals.

Reduction:

By having several experimental groups in parallel in step 1 and 3, the amount of control groups necessary is drastically reduced. Stress responses are known to be a major confounder in fetal programming. By prioritizing animal welfare, the intra-individual variability decreases, which means less animals are needed. Males and females differ in their response to intrauterine challenges, and thus need to be analyzed in separate groups. On the one hand, this reduces the number of animals per group, since there is less intra-individual variability. On the other hand, by analyzing both the males and the females and not only one sex in this experiment, no animals will be wasted and there is no need to replicate the experiment with the other sex later on. We will only use litters containing 4 to 9 pups and shortly after birth, nest size will be regulated by moving pups between the nests to 5 to 8 pups per nest, which, again, decreases intra-individual variability. By accepting these ranges of litter and nest sizes, the percentage of 'successful' pregnancies will be high while intra-individual variability will be kept to a minimum. Furthermore, after weaning, the pups of one dam will be divided into the different offspring groups, to diminish the influence of the nest. Therefore, less nests and thus less dams and pups are

needed. Finally, long-term consequences for both dam and offspring will be analyzed and males are used for multiple rounds of mating, making that no mice will be wasted.

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

With the design of our experiments, we always thought of how to minimize stress for the mice (see 'refinement'). Besides that, the mice will be monitored regularly and observations will be tracked in their welfare diary. If the animal is in distress termination will take place. We will use an adenovirus carrying [REDACTED] Mice will be transferred to the Biosafety Level 2-area of the animal facility before injections, where they will stay in individually ventilated cages until termination. Of all animals, waste will be collected and disposed following local law and regulations.

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.

Extensive literature search has been performed to identify similar studies. The PE models using [REDACTED] [REDACTED] have been studied by other groups, but a systematic comparison, full characterization and long-term studies are lacking. The [REDACTED] model is tested in a pilot study by our group to optimize the method. Research towards metabolic programming by PE is scarce, and the effect of a dietary challenge for the offspring or interventions for the dam is, to our knowledge, not examined yet. Moreover, our epigenetic lab technique for the read-outs has not been used in these models before. During the studies we will of course keep up with literature in our field to prevent unnecessary experiments.

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.

In general, the mice will be socially housed in groups. However, during some procedures group housing is not possible. Mice will be individually housed during, for instance, pregnancy and weaning, metabolic cage and feces collection.

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.

For some procedures, e.g retroorbital injections, it is necessary to sedate the mice with an anaesthetic (isoflurane). This will be for a short amount of time and recovery of the mice after anaesthesia will be monitored.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Metabolic syndrome, obesity and/or diabetes and the symptoms of PE might have adverse effects on animal welfare. Offspring might experience stress *in utero* because of the exposure to preeclampsia.

Explain why these effects may emerge.

The offspring receive a dietary intervention to challenge metabolic capacity. This can lead to the development of the metabolic syndrome, obesity and/or diabetes. Induction of PE will lead to elevated blood pressure and kidney damage in the dams. The offspring might sense that there is something 'not normal' which can cause stress.

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

We will regularly monitor body weight and body composition, and around 3 months of age, glucose-, insulin-, and pyruvate tolerance tests will take place. If the mice by then already show an altered metabolic capacity, there is no need to continue the experiment and to increase the severity of the metabolic problems for the mice. In our current pilot project, the dams do not seem to suffer from the elevated blood pressure and kidney damage. Their general appearance, number of pups, number of fetal resorptions and body weight gain do not differ from the control group.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

Cumulative discomfort:

- Dams: moderate
- Offspring: mild

The males will not get any discomfort-causing treatment.

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.

In step 1, blood pressure of the dam will be measured in the aorta. This is a terminal experiment. In all

steps, tissues and blood of both dam and offspring need to be collected for further analysis. Males will be used for multiple rounds of mating and can be re-used by other groups of for educational purposes afterwards. When they cannot be re-used by others, they will be terminated.

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

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

Yes

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **8096**
2. Titel van het project: **The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring in mice**
3. Titel van de NTS: **Het effect van pre-eclampsie op de gezondheid van moeder en kind op lange termijn in muizen**
4. Type aanvraag:
X nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC : **04-04-2017**
 - aanvraag compleet: **04-04-2017**
 - in vergadering besproken: **13-04-2017**
 - anderszins behandeld: **08-05-2017, 11-05-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot **18-04-2017 tot 08-05-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **08-05-2017**
 - advies aan CCD: **19-05-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.
8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum:
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
 - Gestelde vraag / vragen:
 - Verstrek(e) antwoord(en):
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: **18-04-2017**
 - Gestelde vraag/vragen:
 - 1/ Mogelijk is het raadzaam de diersoort in de titel van project te vermelden alsmede in de titel van de NTS.
 - 2/ De reden om de dieren te termineren lijkt wat kort door de bocht:
 - zo geldt als belangrijke grond voor het termineren dat "blood pressure of the dam will be measured in the aorta and this is a terminal experiment". In hetzelfde projectvoorstel wordt regelmatig bij de dieren "blood pressure measurements using a tail cuff system uitgevoerd". Wanneer enkel niet-invasief de bloeddruk wordt gemeten (aannemende dat deze methode reeds is gevalideerd aan de hand van de bloeddrukmeting in de aorta) vervalt, lijkt het, de grond voor terminatie in dit opzicht.

- De experimenten met het moederdier en nakomelingen zullen terminaal zijn omdat bloeddruk in de aorta gemeten zal worden en de organen verzameld worden. De organen worden verzameld immers "primary outcomes will be and analysis of heart, liver, kidney and blood, since these parameters are most likely to be affected by PE". Zouden niet-invasieve imaging en bloedonderzoek geen alternatief kunnen zijn om functies van organen als hart respectievelijk nieren te monitoren waardoor terminatie zou kunnen worden voorkomen?
- Het verdient misschien aanbeveling in de aanvraag wat nadere toelichting te geven op terminatie als reden voor het verzamelen van placenta's daar tijdens de partus de placenta's natuurlijk in principe automatisch met de pups meekomen.

3/ Het ongerief voor de moeders in appendix 1 zou moeten worden aangepast naar 'moderate'

4/Bij een vastenprocedure van 16 uur zouden de muizen in 'torpor' kunnen gaan. Houdt u daar rekening mee?

5/ Er is sprake van tegenstrijdigheid in de tekst onder I en J van de bijlage: onder I wordt aangegeven dat "If any adverse consequences arise, we will apply the humane endpoints", terwijl onder J wordt gesteld dat geen omstandigheden die mogelijk leiden tot het opwekken van humane eindpunten worden verwacht. Beschrijving van humane eindpunten lijkt (met het oog op met wat onder J gesteld wordt) dan toch wenselijk.

6/ Ten aanzien van de proefopzet en statistiek heeft de DEC een redelijk aantal kanttekeningen en die staan hieronder beschreven onderverdeeld in design, sample size berekening en geschatte aantallen.

Het design is niet erg duidelijk beschreven (m.n. de stappen). Enkele voorbeelden: Stap 2 en 3 beginnen met te stellen dat het meest veelbelovende model uit de vorige stap wordt gekozen (stap 2 -> het model uit stap 1 met het fenotype meest vergelijkbaar met klinische PE; stap 3 -> het model met het meest relevante 'programming defect'), maar in stap 2 wordt daarna gesteld dat ook andere modellen gebruikt kunnen worden. Daarmee wordt de beslis-structuur voor de DEC wat onduidelijk. Stel je kiest in stap twee 1 model dat het voldoende goed doet, dan is dit automatisch het model voor stap 3. Moet je in stap 2 dan niet altijd alle modellen testen om in 3 het meest relevante 'programming defect' te kiezen en om inzicht te krijgen hoe je vanuit de verschillende modellen (in samenhang) delen van het klinisch beeld verklaart? Tevens zou de DEC duidelijker gesteld willen hebben wat de primaire uitkomstparameters zijn in stap 2 en 3 (wel omschreven in stap 1). Bijkomend punt is dat in stap 3 in één keer apart naar vrouwen/mannen wordt gekeken. Zijn man/vrouw verschillen niet mogelijk ook relevant voor de eerdere stappen?

Verder is de sample size berekening onvoldoende beschreven. De DEC zou graag een getalsmatige uitwerking hiervan zien (zowel voor stap 1 als stap 2/3), inclusief de gebruikte power en alfa. Dit mede omdat de paper die de aanvrager citeert een kleinere sample size heeft (n=6-8) dan de sample size (n=12) die men nu voorstelt.

Ook vraagt de DEC zich af of het klopt dat eenzelfde sample size wordt gehanteerd voor stap 1, 2 en 3. Stap 3 is interventie studie, waarbij het waarschijnlijk is dat de 'effect sizes' lager zullen zijn dan in stap 2 (tenzij er complete genezing plaats vindt).

Tevens de vraag of sekse nog een rol heeft gespeeld in de overwegingen, aangezien hier bij mannen en vrouwen apart naar wordt gekeken. Zijn de effecten hetzelfde bij man/vrouw? Is een eventueel sekse verschil iets wat getoetst wordt? Moet je een sekse verschil mogelijk eerst uitzoeken in stap 2 voordat je dit in stap 3 verder kan uitwerken? Etc. En is het waarschijnlijk dat de 'effect size' voor stap 1 (totaal andere uitkomstparameter) precies hetzelfde is?

Ten slotte de geschatte aantallen. De DEC vindt het rekenen met 'we nemen x procent extra' verwarrend, en vraagt zich af of dit correct is. Voorbeeld is stap 2. Er wordt gesteld dat 144 afspring nodig is. Door de extra inclusie van dams zullen er naar verwachting 26 zwangere dieren zijn, die $26 \times 6 = 156$ pups leveren. Hiervan zullen 14.4 dieren getermineerd worden waarmee je zo rond de 141 dieren uitkomt, onder het aantal dat men berekend had nodig te hebben. Verdere onduidelijkheid is dat voor stap 2 en 3 wordt gerekend met een groeps grootte van n=10, terwijl in de 'sample size' beschrijving uitgegaan werd van n=12 per groep.

Verder lastig punt vindt de DEC de behoorlijke overproductie in stap 3 om voldoende variatie te krijgen binnen de condities. Dit lijkt een na te streven strategie om meer variatie te hebben, maar valt dit niet op een andere manier te bereiken? Terminatie na de geboorte van 40% van de afspring vanwege surplus vindt de DEC wel erg veel.

Verder vraagt de DEC zich af of het geheel van stap 3 wel praktisch haalbaar is. De aanvrager wil een 10/10 man/vrouw verdeling met 5 dams die men al moet behandelen terwijl men nog niet weet hoeveel afspring ze gaan krijgen en in welke man/vrouw verhouding (en ze kunnen ook nog een afwijkend nest krijgen qua grootte dat getermineerd moet worden). Klinkt als een enorme kluit waar men 'statistisch gezien' waarschijnlijk nog veel meer dieren voor moet includeren?

Een andere gedachte hierbij is: speelt de kans op een afwijkend nest (terminatie) zich niet af op niveau van elke groep i.p.v. op het niveau van de populatie (50+5 versus 50+10*1)? Op het moment van behandeling (in ieder geval voor de in utero behandelingen) weet men nog niet of men 5 of 6 dieren nodig hebt (6 in het geval van een afwijkend nest) en dus zal men 6 dieren behandelen per conditie (totaal 60 ipv 55). Zullen er vanwege de controle groepen mogelijk minder zijn, maar het is

een schets van zaken waarvan de DEC zich afvraag of de onderzoeker er rekening mee heeft gehouden.

- Datum antwoord: **08-05-2017**
- Verstrek(e) antwoord(en):

1. Titel proposal en NTS gewijzigd
2. Redenen voor terminatie stap 1
 - a. Bloeddrukmeting: invasief meten in de aorta een betrouwbare methode. De functionaliteit van het tail cuff systeem in muizen is discutabel, omdat muizen hier niet goed voor te trainen zijn en de stressrespons dus een grote rol speelt. Daarom willen we hier beide doen, en als de tail cuff waardes waardevol blijken te zijn, omdat ze correleren met de aorta-waardes, kunnen we dit in stap 2 en 3 toepassen. Als de tail cuff methode niet betrouwbaar blijkt te zijn moeten we in stap 2 en 3 terugvallen op de bloeddrukdata uit stap 1.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 2 a in wijzigingen-overzicht.
 - b. Niet-invasieve imaging technieken en bloedonderzoek in de moeder tijdens de zwangerschap zijn geen onderdeel van de klinische criteria. Daarnaast hebben we een groot bloedsample van de moeder nodig voor analyses, meer dan in 1 sample afgenomen kan worden. Met de huidige studie is de hoeveelheid die we verkrijgen met een cardiac puncture amper voldoende voor alle nodige metingen.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 2 b in wijzigingen-overzicht.
 - c. Tijdens de partus worden placentas en resorpties opgegeten door de moeder, dus is verzamelen niet meer mogelijk, tenzij de onderzoeker ze verzamelt tijdens de bevalling. Dat zou grote stress veroorzaken bij de moeder, wat waarschijnlijk gevolgen heeft voor de pups. Daarnaast functioneert de placenta na bevalling waarschijnlijk niet meer hetzelfde als tijdens de zwangerschap, waardoor de analyse ervan niet representatief is voor de situatie tijdens de zwangerschap. Daarnaast is het belangrijk om de plek van de foetus in de uterus te registreren, omdat bekend is dat dit een programming-effect kan hebben.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 2 c in wijzigingen-overzicht.
3. Ongerief moeders
 - a. Ongerief moeders moderate ipv mild
 - Tekst gewijzigd, zie punt 3 a en b in wijzigingen-overzicht.
 - b. Daarnaast is er nog 1 handeling die we graag willen toevoegen: het afnemen van een bloedmonster bij de zwangere dam tijdens de zwangerschap. Dit is nodig om bijvoorbeeld de levels te bepalen.
 - Tekst gewijzigd zie 3 c in wijzigingen-overzicht.
4. Torpor
 - a. Bij een glucose tolerantie test is 16 uur vasten standaard in de literatuur. Wijzelf of collega's hebben nooit problemen gehad met torpor. De muizen zullen tijdens het vasten in hun normale groepsverblijf blijven, waardoor ze warmte beter vasthouden. Ook zullen we extra nestmateriaal beschikbaar stellen voor extra isolatie.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 4 a in wijzigingen-overzicht.
5. Humane endpoints
 - a. Dit is een fout van onze kant. Naar aanleiding van het overleg met de IvD is besloten dat er geen humane eindpunten te verwachten zijn als gevolg van de experimentele procedures.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 5 a in wijzigingen-overzicht
- 6-1. Design
 - a. Beslis-structuur: naar aanleiding van de vragen van de DEC hebben we besloten 2 modellen tegelijk te testen in stap 2, tenzij er niet 2 geschikte modellen worden gevonden in stap 1. De modellen moeten beide klinisch relevant zijn, en daarnaast moeten ze niet exact hetzelfde zijn. Op deze manier wordt de relatie tussen het ziektebeeld van de moeder en de gevolgen voor het nageslacht duidelijker. Als de inductie van preeclampsie op een vergelijkbare manier verloopt is er hierdoor ook maar één controlegroep nodig.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 6-1 a, b, c, d, e en f in wijzigingen-overzicht
 - b. Primaire uitkomstparameters
 - Zie wijzigingen bij de vorige vraag over beslis-structuur
 - Tekst gewijzigd, zie punt 6-1 g en h in wijzigingen-overzicht
 - c. Mannen/vrouwen: het is bekend dat de gevolgen van programming sterk verschillen tussen de geslachten. Ook in stap 1 en 2 worden mannetjes en vrouwtjes dus apart van elkaar geanalyseerd. In stap 1 is de statistische berekening gebaseerd op de moeders. Met een

gemiddelde van 6 pups per moeder zullen hier genoeg pups uit voortkomen om mannetjes en vrouwtjes apart van elkaar te analyseren. In stap 2 was dit al meegenomen in de berekening.

- Tekst gewijzigd, zie punt 6-1 *i* en *j* in wijzigingen-overzicht.

6-2. Sample size

- a. Berekening: In de geciteerde paper is de uitkomst van de insuline tolerantie test, voor ons een belangrijk resultaat, niet significant. Dit is uitgevoerd met een n van 7 of 8 per groep (vrouwen, 3 maanden oud). Een hogere n is dus noodzakelijk. De poweranalyses behorende bij de al vermelde groepsgroottes zijn toegevoegd.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 6-2 *a* in wijzigingen-overzicht.
- b. Eenzelfde sample size voor alle stappen: de sample size van stap 1 is met andere primaire uitkomstparameters uitgerekend dan de sample size voor stap 2 en 3. Omdat er nog niet eerder interventies getest zijn die het programming-effect van preclampsie proberen te verminderen, weten we niet hoe groot de effect size zal zijn. Om relevant te zijn hoeft de effect size echter niet zo groot te zijn dat er een significant verschil optreedt tussen de PE-groep en de interventie-groep. Als de interventiegroep niet meer significant verschilt van de controlegroep, terwijl de PE-groep dat wel doet, geeft dat ook al veel informatie.
- c. Mannen/vrouwen
 - Zie 6.1 *c* in dit document.

6-3. Geschatte aantallen

- a. 'x' procent extra: de verwarring lijkt te zijn ontstaan door het afronden van getallen. Wanneer er gerekend wordt met niet-afgeronde getallen klopt de berekening wel. Voor de helderheid hebben we de decimale getallen in stap 2 aangepast naar hele getallen. Hierdoor is het totaal aantal vrouwtjes niet gewijzigd, het aantal vrouwtjes wat zwanger wordt en dus het aantal pups wel. Hierdoor vragen we in totaal 8 dieren extra aan.
 - Tekst gewijzigd, zie punt 6-3 *a* in wijzigingen-overzicht
- b. $n=10$ of $n=12$ in stap 2 en 3: in stap 2 en 3 geldt $n=10$, de $n=12$ die vermeld werd in onderdeel 2A is een typfout.
 - Tekst gewijzigd, zie 6-2 *a* in wijzigingen-overzicht.
- c. Overproductie stap 3: wij zien hier helaas geen alternatieven voor. Al het nageslacht gebruiken zonder de groepsgrootte te vergroten levert een te grote invloed van het nest van herkomst op. Idealiter zou er uit elk nest slechts 1 mannetje en 1 vrouwtje gebruikt worden, zodat dit volledig onafhankelijke experimentele units zijn. Dit zou echter een veel grotere surplus dieren opleveren. Door uit elk nest 2 mannetjes en 2 vrouwtjes te gebruiken en ook nesten met 1 mannetje of 1 vrouwtje te includeren denken we een middenweg gevonden te hebben tussen de ideale situatie en praktische haalbaarheid. Van de surplus dieren zullen we wel de weefsels opslaan voor latere analyse en/of primaire cellen uit de weefsels isoleren.
 - Tekst gewijzigd, zie 6-3 *b* in wijzigingen-overzicht
- d. Haalbaarheid: voor een 10/10 man/vrouw verdeling met 5 dams zijn er gemiddeld 4 pups per dam nodig, waarvan 2 mannetjes en 2 vrouwtjes. Het zal voorkomen dat een nest geen 2 mannetjes en 2 vrouwtjes bevat. We gaan dit dan compenseren door extra mannetjes of vrouwtjes uit een ander nest te gebruiken. Omdat niet alle vrouwtjes tegelijk zwanger worden, hebben we veel flexibiliteit in het includeren van extra dieren. Dit is uitgewerkt in het volgende punt.
- e. Kans op afwijkend nest: niet alle dams worden tegelijk zwanger, om biologische en praktische redenen. De zwangerschap is slechts 18 dagen, dus we hebben de mogelijkheid om eerst 5 dams aan een behandeling bloot te stellen, en als daar na de bevallingen een niet-buikbaar nest bij blijkt te zitten een extra dam te includeren. Daarnaast beginnen de preeclampsie-inducerende behandelingen, met uitzondering van het genetische model, pas op dag 8 van de zwangerschap. Dit zorgt ervoor dat we flexibel zijn in het plaatsen van dieren in behandelgroepen als we bij aanvang van de zwangerschap nog niet weten in welke groep nog een extra dier nodig is. Het is dus niet nodig om in elke groep gelijk al 6 dieren te behandelen per conditie.
 - Tekst gewijzigd, zie 6-3 *c* in wijzigingen-overzicht.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

- Aard expertise

- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

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.

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

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 (*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. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft helder criteria beschreven op basis waarvan zal worden besloten het project wel of niet te continueren. De DEC 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 van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RUG signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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.

De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel is het ophelderen van de gevolgen (op moleculair niveau) van pre-eclampsie bij de moeder en nakomelingen, dit aan de hand van 1 of meer muismodellen. Het uiteindelijke doel is om intrauterine gen expressie programmering bij pre-eclampsia beter te begrijpen en daarmee de complicatie en de gevolgen hiervan bij de nakomelingen, zoals bijvoorbeeld metabool syndroom en cardiovasculaire aandoeningen, terug te dringen. Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het project betreft een fundamenteel en translationeel onderzoek m.b.t. het hiervoor beschreven directe doel; het uiteindelijke doel zal binnen de looptijd van het project naar alle waarschijnlijkheid niet gehaald worden. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project zijn de proefdieren, en op langere termijn mensen lijdend aan (de gevolgen van) pre-eclampsie

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan.

Waarden die voor mensen bevorderd kunnen worden: door mechanismen in de intrauterine gen expressie programmering bij pre-eclampsie beter te begrijpen kunnen mogelijk zowel de complicatie's als ook de gevolgen hiervan voor het nageslacht, teruggedrongen worden.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RUG signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output en de verkregen financiering.

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 beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

De DEC heeft zich ervan vergewist 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 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 of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **NVT**
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 richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De aanvrager heeft aangegeven dat over het algemeen de dieren, volgens de richtlijnen sociaal gehuisvest worden. Gezien de aard van sommige procedures (b.v. dracht, zogen, huisvesting in een metabole kooi en bij het verzamelen van feces) is sociale huisvesting hachelijk en aanvrager heeft voldoende onderbouwd waarom in deze gevallen individuele huisvesting zal plaatsvinden.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

Dit lijkt realistisch ingeschat. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het ongerief voor de proefdieren te identificeren, te

verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (zie bijlage I voor voorbeeld).

De integriteit van het dier wordt aangetast door het herhaald uitvoeren van tolerantietesten en het toedienen van endotoxines door middel van intraperitoneaal injecteren, het toepassen van anesthesie en individuele huisvesting uiteindelijk leidend tot de opoffering aan het eind van de proeven.

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 beoordeling toe (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC zijn de criteria voor humane eindpunten in deze aanvraag goed beschreven.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager heeft aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De complexe gevolgen van pre-eclampsie zijn niet *in vitro* na te bootsen.

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. Licht uw beoordeling toe (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC 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 de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties

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 beoordeling toe (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC 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.

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. Licht uw beoordeling toe.

NVT, want het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

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. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*; zie *bijlage I* voor voorbeeld).

In de onderhavige projectaanvraag worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. De aanvrager heeft hiervoor naar mening van de DEC voldoende onderbouwing gegeven. Alhoewel de DEC-RUG 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 richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager: dieren worden gedood om weefsel te kunnen uitnemen voor verdere analyse.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

NVT

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging.

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "**The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring**", dat gericht is op het doorgronden van het mechanisme van pre-eclampsie teneinde deze aandoening te kunnen voorkomen dan wel te behandelen bij de mens het lichte dan wel matige ongerief, dat de muizen wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **licht-matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **potentieel reëel voordeel.**

Algemeen: **het ophelderen van het mechanisme van pre-eclampsie aan de hand van 1 of meer muismodellen.**

De DEC-RUG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen binnen het project "**The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring**" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na licht tot matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal onder meer worden aangetast door het herhaald uitvoeren van tolerantietesten en het toedienen van endotoxines door middel van intraperitoneaal injecteren, het toepassen van anesthesie en individuele huisvesting uiteindelijk leidend tot de opoffering aan het eind van de proeven. Dit zal ook repercussies hebben op hun natuurlijke gedrag.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een uitbreiding van wetenschappelijke kennis over het mechanisme van pre-eclampsie teneinde deze aandoening te kunnen voorkomen dan wel te behandelen bij de mens. Voor de maatschappij is verbetering van het welzijn mogelijk ten aanzien van het in positieve zin beïnvloeden van de negatieve aspecten van deze aandoening. Dit verhoogt de levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven bij de moeders en mogelijk ook het nageslacht ervan.

Vandaar dat de DEC-RUG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk, translationeel als vanuit maatschappelijk oogpunt, van reëel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

De DEC-RUG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project "**The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring**", de opoffering en het lichte dan wel matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project bevestigend.

Hoewel de DEC-RUG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het reële belang van dit project naar haar mening wat zwaarder.

De DEC-RUG is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

De DEC-RUG 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. De DEC-RUG 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-RUG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "**The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring**" als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RUG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

2. 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*).

N.v.t. De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171824

Bijlagen

2

Datum 23 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 mei 2017. Het gaat om uw project "The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1050020171824. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

23 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171824

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171824

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1 [REDACTED]
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171824

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Universitair docent
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: 15 juni 2017
Geplande einddatum: 15 juni 2022
Titel project: The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring
Titel niet-technische samenvatting: Het effect van preeclampsie op de gezondheid van moeder en kind op lange termijn
Naam DEC: DEC-RuG
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
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: Hoogleraar RUG
Plaats: Groningen



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171824

Bijlagen

2

Datum 23 mei 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 mei 2017

Vervaldatum: 22 juni 2017

Factuurnummer: 171824

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1050020171824	€ 1035,-

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

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171824

Datum 26 mei 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 19 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring" met aanvraagnummer AVD1050020171824. 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

Er worden pups gedood vóór de geboorte en ná de geboorte. Kunt u aangeven hoeveel pups er vóór de geboorte gedood worden en hoeveel erna?

De pups worden gedood door decapitatie. Dit is alleen toegestaan als een andere dodingsmethode niet mogelijk is. Kunt u aangeven waarom andere dodingsmethodes niet mogelijk zijn?

Er worden 35 mannelijke dieren ingezet voor de fok. Deze dieren zullen geen ongerief ervaren en vallen hiermee niet onder een dierproef. Kunt u het aantal dieren in de NTS aanpassen naar 1971, zodat deze mannelijke fokdieren niet meegeteld worden? U kunt deze dieren eventueel wel benoemen.

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.

Datum:

26 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171824

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD1050020171824

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:

26 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171824

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

Aanvulling CCD AVD1050020171824

- Aantal pups vóór en na geboorte getermineerd

In stap 1 zullen de foetussen getermineerd worden op dag 18 van de zwangerschap. Naar schatting zullen dit 954 pups zijn. In stap 2 en 3 zullen de pups die niet gebuikt worden in het lange-termijn experiment kort na de bevalling getermineerd worden. Naar schatting zijn dit 166 pups.

- Waarom pups termineren met decapitatie

Omdat verschillende organen, waaronder de hersenen, en een bloedmonster moeten worden afgenomen, is het belangrijk een methode te gebruiken waarbij dat mogelijk is. Foetussen zijn ongevoelig voor terminatie met behulp van CO₂ of een overdosis anesthetica. Met decapitatie kan er direct een bloedmonster afgenomen worden en blijven de weefsels intact. Daarnaast is deze methode van terminatie sneller en betrouwbaarder bij deze kleine dieren dan cervical dislocation.

- Mannetjes zijn geen proefdieren

35 mannetjes zijn verwijderd uit de NTS.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171824
Bijlagen
1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 19 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring" met aanvraagnummer AVD1050020171824. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof het aantal foeten, de dodingsmethode van de foeten en een aanpassing van de NTS in 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.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 juni 2017 tot en met 14 juni 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RuG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 mei 2017. 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 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:
6 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171824

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:



in opdracht van

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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1 [REDACTED]

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 juni 2017 tot en met 14 juni 2022, voor het project "The effect of preeclampsia on long-term health of mother and offspring" met aanvraagnummer AVD1050020171824, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RuG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD kandidaat.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 19 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 19 mei 2017, ontvangen op 19 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Preeclampsia and long-term programming of health				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	1.971	18% Matig 82% Licht	

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.

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

Aanvraagnummer:
AVD1050020171824

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:

AVD1050020171824

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:

AVD1050020171824

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 W17-11		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS20171825	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x		x	
5	DEC-advies				x	x	x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Vraag en antwoord aanvulling				x		x		
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x		

1825

26 MEI 2017



1.

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 . 0 6 . 2 0 1 7
- Einddatum 0 1 . 0 6 . 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- PIC hydrogels for wound dressing purposes
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het karakteriseren van nieuwe vloeibare pleisters
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres
- E-mailadres

4 Betaalgegevens



- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.035,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	23 - 05 - 2017
Handtekening	

Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 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 of routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
- 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.
-

Burns are complex types of wounds (see fig. 1). First degree burns only affect the epidermis and often do not need special care to heal normally (e.g. sunburns). Second degree burns extend into the dermis, while third degree burns affect deeper tissues. These often large wounds are very prone to infections. Moreover, severe skin wounds following burns, trauma, or surgery often lead to scar formation and impaired functionality, aesthetical, and psychosocial problems. Cutaneous wound repair is a dynamic and highly regulated process, involving several overlapping phases: inflammation, proliferation, and remodeling [1]. Aberrant wound repair and scarring occurs after prolongation of the inflammatory phase that together with oxidative stress fuels (myo)fibroblast proliferation and interferes with myofibroblast apoptosis. This leads to disproportionate deposition of extracellular matrix proteins, subsequently promoting excessive scar formation. Unfortunately, conventional therapies to accelerate wound repair and to prevent scarring are insufficient.



Figure 1: Examples of burn wound patients suffering from excessive scarring. On the left, a significant part of the patient's back is affected. Scarring on the shoulder limits rotation of the arm. In the middle, scarring on the forearm has made the patient's skin more tight, limiting the use of his hand. On the right, severe scarring on the elbow and forearm have reduced the patient's ability to stretch the arm completely.

Burns account for a significant part of morbidity, and thus contribute to a large portion of hospitalization times, disfigurements, and disabilities. It was reported that over 7.1 million burn related injuries occur worldwide every year, resulting in 18 million Disability Adjusted Life Years (DALY's) [2]. These injuries occur predominantly in low income countries, due to the use of primitive stoves for cooking and heating [2, 3]. Burns are one of the most common household injuries and have a remarkably high incidence rate among infants. It has been reported that modern treatment of burns in the western world may cost up to \$1000 per day [4]. The total spending on healthcare of burn wounds is thus very high, and the desire for new and cheaper treatments that preferably reduce hospitalization times is desired. Current wound dressing techniques are far from optimal [5-9]. Burn wounds often suffer from complications such as prolonged inflammation and excessive collagen deposition that nearly always result in excessive scar formation [10, 11]. However, another important factor plays a major role in the treatment of burn wounds. Namely, the comfort of the patient. Dressing changes tend to be frequent (often daily) and almost always extremely painful, which leads to great patient discomfort [12]. Patients are thus often very afraid to renew their bandages. Moreover the currently used plasters and dressings have a high risk of damaging the underlying regenerating wound area as well as increase the size of the wound when it is removed [12]. This repeated injury to the healing wound causes novel inflammatory reactions that can refuel the myofibroblast activity promoting chronic inflammation and scar formation.

Thus, new and improved wound dressings are desired that are easy to use, not discomforting for the patient, and may actively help the wound healing process. Recently, a novel hydrogel, polyisocyanopeptide (PIC) gel, has been developed by the group of professor [redacted] Nijmegen [13]. This synthetic material consists of a poly-isocyanopeptide (PIC) polymer dissolved in water (or a similar medium). It exhibits mechanical properties that perfectly match those of collagen and fibrin filaments, more specifically it is the only synthetic gel in the world that displays the strain stiffening properties of the natural extracellular matrix (ECM) that control cell motility and differentiation [14]. Since these gels

mimic the extracellular micro-environment of humans it can be expected that they can promote tissue integrity and homeostasis. In addition, the polymer solution has a thermo-sensitive gelation property, meaning that the 3D gel scaffold is only formed upon warming. The liquid polymer dressing can [redacted]. This enables [redacted]. The [redacted] is then [redacted]. This allows [redacted]. We suspect [redacted] removes the gel without disturbing the wound repair process, in contrast to current wound plasters and dressings. [redacted] can also be [redacted]. Lastly, PIC hydrogels may be able to [redacted]. We speculate possible future applications of [redacted] to prevent or treat infections. In addition, [redacted].

If we compare PIC gel dressings to products currently used by the dutch burn wound institute we can identify several improvements. Hydrocolloid dressings (e.g. Duoderm), transparant film dressings (e.g. Tegaderm), and hydrofibers (e.g. Aquacel) are typically difficult to apply to irregular areas (e.g. fingers). They must be cut to fit the shape of the wound, and often have an adhesive edge that should not be applied to the wound but instead to the undamaged surrounding skin. Furthermore, recent studies have shown that silicone-, poly-urethane-, and hydrocolloid-based wound dressings still damage the stratum corneum upon removal [15, 16], which suggests that all sheet- or bandage-based dressings may damage the wound bed to some degree. PIC gel is strictly easier to apply, as you can [redacted]. We speculate the risk of re-injury of the wound upon removal of PIC is very low, as [redacted]. In addition, therapeutic PIC gels may be developed later that can replace some of the currently used products. For example, [redacted], such [redacted], may be replaced with [redacted] as these can serve as both the primary wound dressing and [redacted]. Lastly, it is important to point out some of the differences between currently used amorphous hydrogel wound dressing products and PIC gels. Many different source materials for the formation of these hydrogels exist. Examples include Chitosan (a polysaccharide harvested from crustaceans), Glycerol gels (harvested from plants/animals or produced synthetically), and Carboxymethyl cellulose & propylene glycol gels (synthetic). All these gels have one or several characteristics that are beneficial to a certain application. For example, chitosan gels are popular because their biological origin make them very biocompatible and they have inherent antibacterial properties [17]. While certain other gels may not be inherently antibacterial but offer other benefits, such as *in situ* formation [18, 19]. A typical problem of biological gels is that the product may suffer from batch-to-batch inconsistencies, as they are harvested from animals or plants. While synthetic gels are often complex to produce, and can sometimes leave toxic break down products. We believe PIC gels may combine and even improve many of these characteristics into one easily produced synthetic product. For example, PIC gels [redacted]. Moreover, the [redacted] PIC gels could result in [redacted]. Even removal of the gel from the wound may be improved by [redacted] and thus reduce patient discomfort. PIC gel also distinguishes itself from competing products in other practical aspects. For example, in 2015 Zeng et al. presented a thermosensitive Bioglass/Agarose-Alginate hydrogel wound dressing intended for chronic wounds [20]. However, their product is formed by mixing and maintaining the components above 50°C, then applying it to the wound and letting it gelate upon cooling down to physiological temperatures. PIC gels distinctly

differ themselves from products such as these, because

. This is practical as the dressings can

. The clinician may then

So to summarize the potential characteristics of PIC gel that may be beneficial either clinically or commercially:

- The application process of PIC gel dressings becomes simple by . This should make application in difficult areas, such as fingers or toes, significantly easier.
- Dressing removal by may improve patient comfort by being less painful than current methods. Moreover, this mild replacement technique may prevent repeated damage to the healing wound and may allow the repair process to continue without interference. We postulate that the removal of the gel results in less inflammation and doesn't promote scar formation.
- Due to the , the dressing may and .
- The gel may
- can be achieved simply:
- The material is fully synthetic, and thus does not involve the use of animals or plants in its production. This also means its production is more easily upscaled and that healthcare costs can be reduced by streamlining the production process.
- PIC can be produced beforehand and are easily stored under sterile conditions in fridges or freezers.

To translate this PIC gel into a Phase 1 clinical study on human patients, a consecutive series of preclinical experiments has to be performed. Therefore, the project is divided into workpackages that focus on:

We have already demonstrated that PIC gel production can be standardized and that the gel can pass cytotoxicity testing (Fig 2). PIC gel shows similar non-toxic behavior as Matrigel, a thermosensitive hydrogel that is commonly used for cell culture applications (but may not be applied in humans due to being derived from murine tumors). This warranted the start of animal studies, as required to initiate a Phase 1 clinical trial and for CE approval. Previously, our consortium performed two mice studies at the CDL animal facility in Nijmegen. In the first study (DEC 2013-138), we applied PIC and RGD-peptide functionalized PIC gel wound dressings to full thickness wounds. The histological effects were studied after 3 and 7 days of wound healing. It was found that

In addition, the results lead to experimental optimizations and insights that were helpful in the design of new studies. In the second study (WP 2014-208-009) an experiment was performed involving imaging of radio-actively-labeled PIC gel with a SPECT/CT scanner. The purpose of this study was to track the migration of PIC gel in the wounded mouse over 7 days. The previous study taught us that mice disturb the gel in the wound by licking it clean, and thus we introduced a secondary dressing (consisting of a Tegaderm sheet and a bandage) to shield the wound and gel from the mouse. We concluded that

From these studies it became evident that the PIC gel is

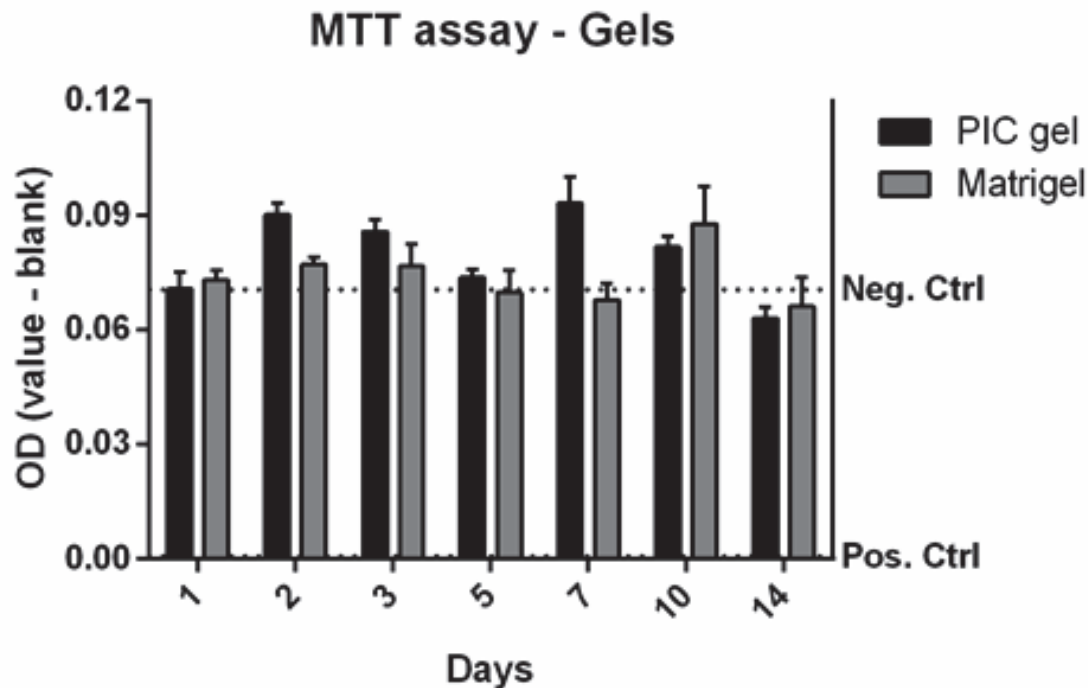


Figure 2: MTT assay for metabolic activity. Human dermal fibroblast activity was not significantly decreased after coming in contact with PIC gels (4 mg/ml) or the commercially available Matrigel (control product). This implies the gel is non-toxic to fibroblasts, the most abundant cell type in wounds.

We hypothesize that the PIC gel wound dressings may fill a gap in current dressing techniques by

Therefore, we are convinced that the possible clinical benefits of the PIC gel weigh up against the use of mice in the experiments proposed in this application.

One key aspect of the PIC gel project is to establish [REDACTED]. Our previous study showed that [REDACTED] should occur before the wound is fully closed to try and prevent encapsulation of the gel. Therefore, in this DEC application, we would like to focus on characterizing [REDACTED]. In the current study, full thickness wounds will be introduced to mice and treated in a similar manner as our previous studies. Namely, by applying a PIC hydrogel dressing and protecting it with a secondary dressing consisting of Tegaderm and a Bandage. However, wounds will now be followed with histology for a longer period of time (up to one month) and the effect of [REDACTED] will be studied. SPECT/CT imaging will be used once more, specifically to test and quantify [REDACTED]. Such imaging and (immuno)histochemical studies are significantly easier to perform in small animals such as mice. The goal is to show the viability of the complete PIC gel wound dressing technique, involving [REDACTED]. Burns are a complex and very discomforting type of wound, which makes them less desired in this specific study. Therefore, because the goal here is purely to demonstrate the viability of PIC gels as wound dressing, we are convinced that the relatively 'clean' and undisturbed model of wound healing, namely the splinted full thickness wound in mice, is an optimal choice. Successful completion of this study would lead to a new wound dressing product and subsequently will be followed by large animal studies (involving pigs) and eventually phase 1 clinical trials. In addition, it will open doors to new studies involving [REDACTED]

The study proposed here is part of a larger series of studies in the framework of a project with the acronym [REDACTED] that is granted by ZonMW. The project is executed by a consortium of university partners (i.e. the Radboud University, Radboud university medical center, Free University medical center) as well as the Association of Dutch Burn Centres, the Dutch Burns Foundation and the company [REDACTED]. Each of the partners has a specific role in [REDACTED]. The final aim is to develop a passive wound dressing technology for burn wounds and to carry out an initial clinical patient trial (Phase 1) on donor site skin wounds. At the end of the project, the goal of all partners is to have a commercial prototype market ready. In addition, studies will be initiated to develop the gel technology further to allow active participation and intervention in the wound repair process.

Literature:

1. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V (2009) The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 37: 1528-1542.
2. Rybarczyk MM, Schafer JM, Elm CM, Sarvepalli S, Vaswani PA, Balhara KS, et al. (2016) Prevention of burn injuries in low- and middle-income countries: A systematic review. *Burns* 42: 1183-1192.
3. Peck MD (2011) Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. *Burns* 37: 1087-1100.
4. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN (2009) Burn prevention mechanisms and outcomes: pitfalls, failures and successes. *Burns* 35: 181-193.
5. Hutchinson JJ, McGuckin M. Occlusive dressings: a microbiologic and clinical review. *American journal of infection control*. 1990;18(4):257-68.
6. Hanna JR, Giacobelli JA. A review of wound healing and wound dressing products. *The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*. 1997;36(1):2-14; discussion 79.
7. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(8):2892-923.
8. Gupta B, Agarwal R, Alan M. Textile-based smart wound dressings. *Indian J of Fibre*. 2010:174-87.
9. Dhivya S, Padma VV, Santhini E. Wound dressings - a review. *BioMedicine*. 2015;5(4):22.
10. Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, et al. (2015) Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical Care* 19: 243.

11. van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MW, Molema G, van Zuijlen PP, Middelkoop E, et al. (2009) Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns* 35: 15-29.
12. Hollinworth H, White R. (2006) The clinical significance of wound pain. In: White R, Harding K, editors. *Trauma and pain in wound care*. Wounds UK, 3-16.
13. Kouwer, P. H., Koepf, M., Le Sage, V. A., Jaspers, M., van Buul, A. M., Eksteen-Akeroyd, Z. H., Hoogenboom, R. (2013). Responsive biomimetic networks from polyisocyanopeptide hydrogels. *Nature*, 493(7434), 651-655.
14. Jaspers, M., Dennison, M., Mabesoone, M. F., MacKintosh, F. C., Rowan, A. E., & Kouwer, P. H. (2014). Ultra-responsive soft matter from strainstiffening hydrogels. *Nature communications*, 5.
15. Waring M, Bielfeldt S, Matzold K, Wilhelm KP, Butcher M (2011) An evaluation of the skin stripping of wound dressing adhesives. *J Wound Care* 20: 412, 414, 416-422.
16. Matsumura H, Imai R, Ahmatjan N, Ida Y, Gondo M, Shibata D, et al. (2014) Removal of adhesive wound dressing and its effects on the stratum corneum of the skin: comparison of eight different adhesive wound dressings. *Int Wound J* 11: 50-54.
17. Sapru S, Ghosh AK, Kundu SC (2017) Non-immunogenic, porous and antibacterial chitosan and Antheraea mylitta silk sericin hydrogels as potential dermal substitute. *Carbohydrate Polymers* 167: 196-209.
18. Balakrishnan B, Mohanty M, Umashankar PR, Jayakrishnan A (2005) Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* 26: 6335-6342.
19. Van Tomme SR, Storm G, Hennink WE (2008) In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Pharm* 355: 1-18.
20. Zeng Q, Han Y, Li H, Chang J (2015) Design of a thermosensitive bioglass/agarose-alginate composite hydrogel for chronic wound healing. *Journal of Materials Chemistry B* 3: 8856-8864.

3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project is to undoubtedly show the viability of a wound dressing technique involving the application and removal of thermosensitive PIC hydrogels. Two sub goals have been set in order to reach this objective.

First, the impact of PIC hydrogels on various stages of the wound healing process has to be characterized. To this end, the status of certain wound healing markers will be tested and compared on a histological level between control wounds and PIC gel treated wounds. In addition, the rate of wound contraction is tracked and compared. Thus, the first goal is to investigate the impact of these gels on both the early (inflammatory, proliferative) and late (remodelling, healed) phases of undisturbed wound healing. Any evidence that supports the notion that PIC gels can facilitate or aid in wound healing helps support the ultimate goal of presenting these gels as viable wound dressings, and may help in preventing negative wound healing outcomes in patients.

Second, we want to see if the application and removal method we have envisioned for the PIC gel wound dressings is realistic. In the clinic, this will involve application of the gel [REDACTED] Later, when the dressing requires replacement, the plan is to

[REDACTED]. Thus, in this project, we intend to investigate if this approach is correct. This is achieved by looking at [REDACTED] the [REDACTED], and [REDACTED]. If this study shows that the PIC gels are [REDACTED], and [REDACTED], it will help support the viability of this concept in a clinical setting and may lead to a product that is less painful to patients during dressing changes.

The study from this proposal will be performed by [REDACTED] of the Radboudumc, Nijmegen. We have sufficient past experiences with [REDACTED]. In addition, we are supported by [REDACTED] of the Radboud University [REDACTED] (Nijmegen) and who will supply our PIC gel material as well as actively be involved in the design and performance of the studies. The design of the study is explained further in the next sections.

3.3 Relevance

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

General relevance - Maintain Health, prevent health care:

The envisaged product should prevent infection, resulting in shorter medical treatment, reducing potential fatalities, and should reduce cosmetic and functional problems, thereby significantly decreasing disability-adjusted life years (DALY's) and hospitalization times. The product has the potential to be used by the patient him-/herself thereby reducing hospitalization times, and accompanying costs, even more. The reduction of functional- and psychological problems should result in a better, more active and longer participation in society and less intra- and extramural care.

Societal/economic relevance

In view of the unacceptable loss of functionality, psychological impact, and high morbidity rate following (burn) wounds, the clinical relevance and societal/economic impact of the present project is evident. There is an urgent need to further explore prevention or attenuation of hypertrophic scar formation to prevent cosmetic and functional problems. Elucidating the mechanisms of the customizable PIC hydrogel on the different phases of wound healing is a key research issue, awaiting detailed investigation. We have established valuable collaborations and networks with both clinical and preclinical experts in the field of wound healing, inflammation, and oxidative stress, enabling us to receive various important tools and know-how. Using mechanistic studies, the present project aims to identify the role of the PIC hydrogels in modulating down-stream inflammatory and effector mechanisms. The combined unique expertise from our different partners ranges from basic research, preclinical models, industrial production, to patient treatment and forms a unique opportunity to study the interaction between inflammation, bioactive molecules, and scar formation. It can be envisioned that amelioration of wound repair using the customizable hydrogel results in novel therapeutic targets for the treatment of hypertrophic scar formation. This research has direct important societal relevance.

Scientific relevance

The success of this study is crucial for the continuation of [REDACTED]. The studies our consortium has planned involve [REDACTED]. To justify the start of those studies, it must be proven that the PIC gels can (A) function as wound

dressing, and (B) are applicable and removable as we have intended. Our past studies have already confirmed that PIC gels are [REDACTED], so the current study focuses primarily on confirming that our removal method is probable and efficient.

3.4 Research Strategy

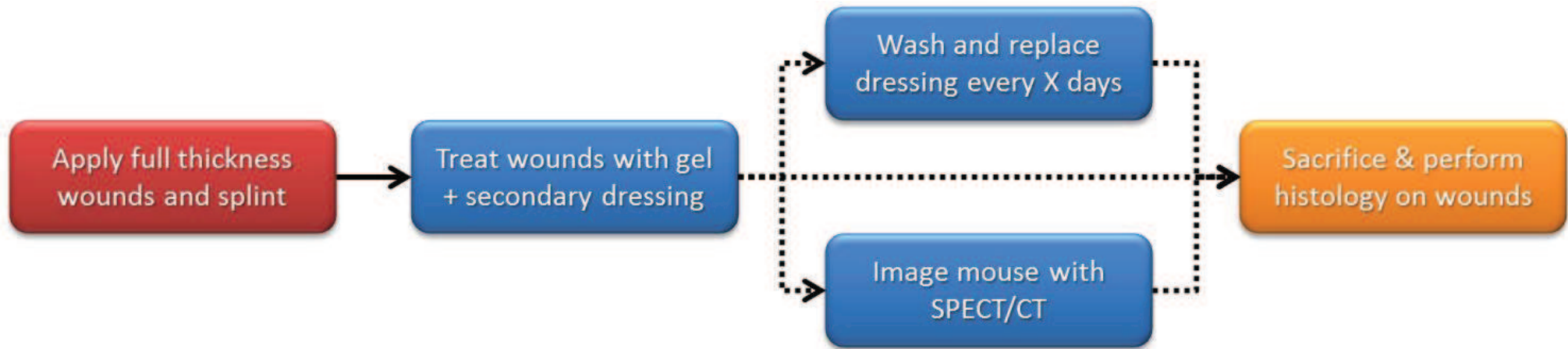
3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

In this study, mice are employed to study the wound healing process of full thickness skin defects that are treated with thermoreversible wound dressing products. All mice are subjected to the same procedure that involves the creation of two identical full thickness skin wounds (with a biopsy punch) in the dorsal skin. The wounds are splinted with a silicone ring that is glued in place around the wound using tissue glue. The purpose of the splint is to prevent wound contraction by primary intention. In further detail, mice possess a subcutaneous muscle layer (the *panniculus carnosus*) that is absent in humans. By including the splint, murine wounds must contract through similar mechanisms as human wounds, namely by epithelial migration, myofibroblast contraction, and collagen deposition. The primary wound dressing is now applied to the wound, which in our case will be a thermoreversible wound dressing product (PIC hydrogel). Because mice tend to clean themselves (and their wounds) thoroughly, a secondary dressing is put in place to shield the gel from outside influences. This dressing consists of a layer of tegaderm (clinically used transparent film dressings) and a gauze/bandage wrap. Wounds are then allowed to heal over time and animals are sacrificed at 3 different time points that allow evaluation of the different phases of wound repair.

In a clinical setting dressing changes are regular (often daily), as wound exudates tend to build up in the dressing over time. To simulate this, we will include a washing group where PIC hydrogel is [REDACTED] and then re-applied repeatedly over the course of the study. The purpose of this procedure is to compare it to groups that [REDACTED] and then evaluate if [REDACTED] can damage the healing wound. In addition, this will tell us if gels are [REDACTED].

We chose for a clean wound healing model (the humanized full thickness wound model) as it is a simple method that is less discomforting than other methods (e.g. burns) that still allows us to answer our research question: namely, if the proposed PIC hydrogel based wound dressing method is viable for clinical studies. This wound model is popular because it demonstrates the major wound healing mechanisms such as epithelialization, contraction, dermal reconstitution, inflammation, chemotaxis, angiogenesis, matrix deposition & organization, and cosmetic outcome [1]. In addition, we choose mice as our animal model because this study involves extensive histological and SPECT/CT analyses. These two analysis methods are significantly easier to perform in the mouse for several reasons. The primary reasons are that a lot of research tools are available for mice (e.g. antibodies for immunohistochemical stainings) and that SPECT/CT imaging is significantly easier in small creatures such as mice (due to the size requirement of the SPECT/CT scanner). Future studies, that will be designed and performed based on the results obtained in the current study, will include [REDACTED].

The flow-chart below summarizes the strategy:



References

1. Wang X, Ge J, Tredget EE, Wu Y (2013) The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. Nat Protoc 8: 302-309.

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

To evaluate the outcome of wound healing we will use two primary readout methods: Tissue characterization (by photography and (immuno-) histochemical stainings) and radio-active imaging (SPECT/CT). For the latter group, special DTPA-conjugated PIC hydrogels are produced and then labeled with In-111 (a radio-active tracer). This allows us to track the presence and quantity of PIC hydrogel within the wounds, as well as the rest of the body, and is primarily used to assess the ability of the gel to stay adherent to the wound as well as the [REDACTED].

The following experimental groups are included:

- 0) Pilot group.
- 1) An untreated control. Receives only the secondary dressing (to protect the wounds and splints), may be considered 'sham treatment'.
- 2) PIC hydrogel (single application).
- 3) PIC hydrogel which is [REDACTED] replaced repeatedly (every 2-to-4 days).
- 4) PIC-In111 hydrogel.

In groups 1, 2, and 3, histological samples are collected at three important time points. Namely:

- The inflammatory phase (day 3) - shows initial response to the gel, and is marked by presence of inflammatory cells

- The proliferative phase (day 7) - shows the induction of myofibroblast cell types, and the start of collagen production
- The remodeling phase (day 14-to-28) - shows how myofibroblast activity decreases, and collagen structures are actively remodeled into a more durable matrix

We intend to [REDACTED] replace the gel (in relevant groups) every 3 days, so we request a time frame of every 2-to-4 days for more flexibility. It is possible that the secondary dressing (consisting of a Taderm sheet and bandage wrap) may suffer from wear-and-tear and require replacement after a certain time. Thus all animals may have to undergo additional anesthesia moments to carefully refresh these dressings in case it is deemed necessary. A pilot study involving a few mice is performed first, to study the behavior of the mice and the dressings for a period longer than 7 days. In this pilot group we want to simultaneously identify the best third time point for our main study (day 14, 21, or 28). Thus a mouse is sacrificed at day 14, 21 and 28. The best time point is determined based on a few properties. For example, after a long time (28 days) the healing of the wounds may be finished already, making comparison between experimental conditions more difficult. Furthermore, we may find that day 14 is a good moment to assess the state of the remodeling phase. In that case, ending the experiment at day 14 is the best choice as it means animals have to suffer for a shorter amount of time and there are also less handling moments for the researchers. In addition, there are pilot mice that will be used to [REDACTED]

In group 4, histological samples are only collected on the final day. SPECT/CT scans are the primary interest and obtained at intermediate points to track the presence of the gel in or on the mouse. Because animal sacrifice is not required for the intermediate measurements, less animals are required. In this group, radio-active PIC gel is applied on day 0 and the activity is measured with the SPECT/CT scanner. Every 3 days thereafter, the activity on the mouse is scanned once more. Then, the gel is [REDACTED] and the mouse is scanned once more. This shows the [REDACTED]. After the second scan, a new dose of gel is applied and the secondary dressing is replaced. Due to technical limitations with radio-active material (i.e. the physical decay time of In-111 is 2.8 days) this experiment is limited to 9 days. Thus, we plan to scan on day 0, 3, 6 and 9. On each intermediate time point we can assess the current state of activity and decide whether it is feasible to continue on to the next time point.

Anesthesia is applied during all experimental steps (i.e. surgery, dressing changes, and SPECT imaging). Analgesia is applied prior to and after surgery. Photographs taken are whenever it is possible, i.e. when the secondary dressing is not present and the wounds are visible. These moments are right after surgery and sacrifice, as well as during [REDACTED].

Due to the amount of animals and time required for treatment and sacrifice, we plan to perform the experiments in a step-wise manner. We calculated that we need, at the most, 89 mice for these experiments and pilots if we include an additional 10% animals to account for unexpected failures.

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

Each group serves a specific purpose to answer the main research question:

- Group 1 (untreated control) serves as a comparison for the other groups. No PIC gel is applied in these wounds, making it an accurate representation of unimpaired wound healing.

- Group 2 (single PIC gel application group) shows the long-term impact of a single application of the PIC gel wound dressing. The effect on wound histology of a single PIC gel application was investigated previously, but never beyond 7 days. The main purpose of this group is to explain the effects of long-term exposure to PIC gels.
- Group 3 (dressing change group) is similar to group 2, but will instead receive regular dressing changes. This group shows if [REDACTED] steps have a negative impact on the histological state of the wound bed, and also if replacing the gel at intermediate points results in a different long-term outcome than a single application. This group directly mimics how the PIC gel dressings would be applied in a clinical setting.
- Group 4 (radio-active imaging group) aims to both visualize and quantify [REDACTED]. Ideally, the wound dressing is completely removed after [REDACTED]). This group aims to justify our intended clinical application method by showing that gel can indeed be removed and replaced as easily as we postulate.

In group 4, go/no-go moments exist after each time point. On each of these points it can be estimated whether or not the amount of radio-active signal remaining in the PIC gel will be enough to image on the next time point. For day 3 and 6 this is likely, as those points were included and measurable in the previous study (WP 2014-208-009). On day 9, however, the amount of signal might be too low to make an accurate measurement. Thus, on the previous time point (day 6) a calculation will be performed to see if it's feasible to continue on to the final time point (day 9). If not, the experiment is ended prematurely.

However, two pilot experiments are performed first. In the first one, the dressing changes planned for group 3 and 4 are practiced. Simultaneously, mice are kept up to 28 days to identify any unforeseen problems of maintaining our experimental conditions for longer than 7 days. Given our experience with the model so far, we don't expect to encounter any problems that would result in cancellation of the entire experiment. However, we may identify some issues that could lead to modification of our intended plan. For example, if the bandage wrap applied as a secondary dressing does not last beyond 2 weeks (due to physical wear-and-tear), it may mean we have to replace this at intermediate points for all groups. In the second pilot, several washing methods are practiced. The [REDACTED] are all variables that may be tuned to come up with [REDACTED]).

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	Full thickness wounds in mice

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Full thickness skin defects are used to mimic typical wounds seen in the clinic. To enhance the wound model and make it more comparable to the human healing process, silicone ring splints are glued around the wounds. The purpose of these splints is to prevent wound contraction by activity of the panniculus carnosus muscle. Contraction may then only occur by epithelial migration and myofibroblast activity (i.e. collagen deposition and wound edge migration), just like in humans. This is called the humanized wound healing model.

To reach the goals set for this project, the status of wound healing has to be compared between groups and at the specified time points. In order to make this comparison, several wound healing parameters have been selected that should allow us to objectively compare these statuses.

(1) Wound contraction rate - By photographing the wound during surgery, and again when the experiment is finished; the contours of the wound can be measured using computer software. This reveals the rate at which wounds contract, and is a measure for epithelial migration and myofibroblast contractile activity. It concerns primarily the proliferation and granulation phases of wound healing (day 7-28).

(2) Inflammatory response - Histological stainings are used to investigate the inflammatory response in the wounds. This is a natural process, but wounds may become infected and foreign materials may trigger a foreign body response. Immuno stainings for macrophages (F4/80 marker) and granulocytes (GR-1 marker) reveal the presence of inflammatory cell types, while general stainings (i.e. H&E staining) show the topography of the wound during the inflammatory phase as well as the presence of giant cells. This parameter concerns mainly the inflammatory phase of wound healing (day 1-6), but will also reveal the presence of a prolonged inflammatory state (i.e. infection) at later time points.

(3) Wound repair status - When damage to the skin is obtained, the lost tissue is repaired with a replacement structure. This structure is built in the proliferation phase and then re-arranged in the granulation phase. Immuno staining for α SMA will show the influx of myofibroblasts (collagen producing cells with a contractile phenotype) as well as the number of bloodvessels (these may increase in number while the wound is being repaired). General stainings are performed to characterize the topography of the wound (i.e. H&E staining) as well as quantitatively and qualitatively assess the amount of collagen replacement structures (i.e. AZAN staining). This parameter primarily concerns the proliferation phase (day 7) and the granulation phase/end result of wound healing (day 10-31).

Characterizing not only the quantity of wound related cells, but also the topographical appearance of the wound is important. In this project, certain groups of mice have their wounds washed and have the wound dressing replaced. We want to investigate if this procedure can damage the wound, and thus both qualitative and quantitative analysis methods need to be employed.

In addition, a SPECT/CT imaging study is included (that follows a similar practical procedure as our pilot study WP 2014-208-009) that involves the use of radio-actively labeled PIC gels. In this group, histological results are only obtained at the final time point. At intermediate time points, the

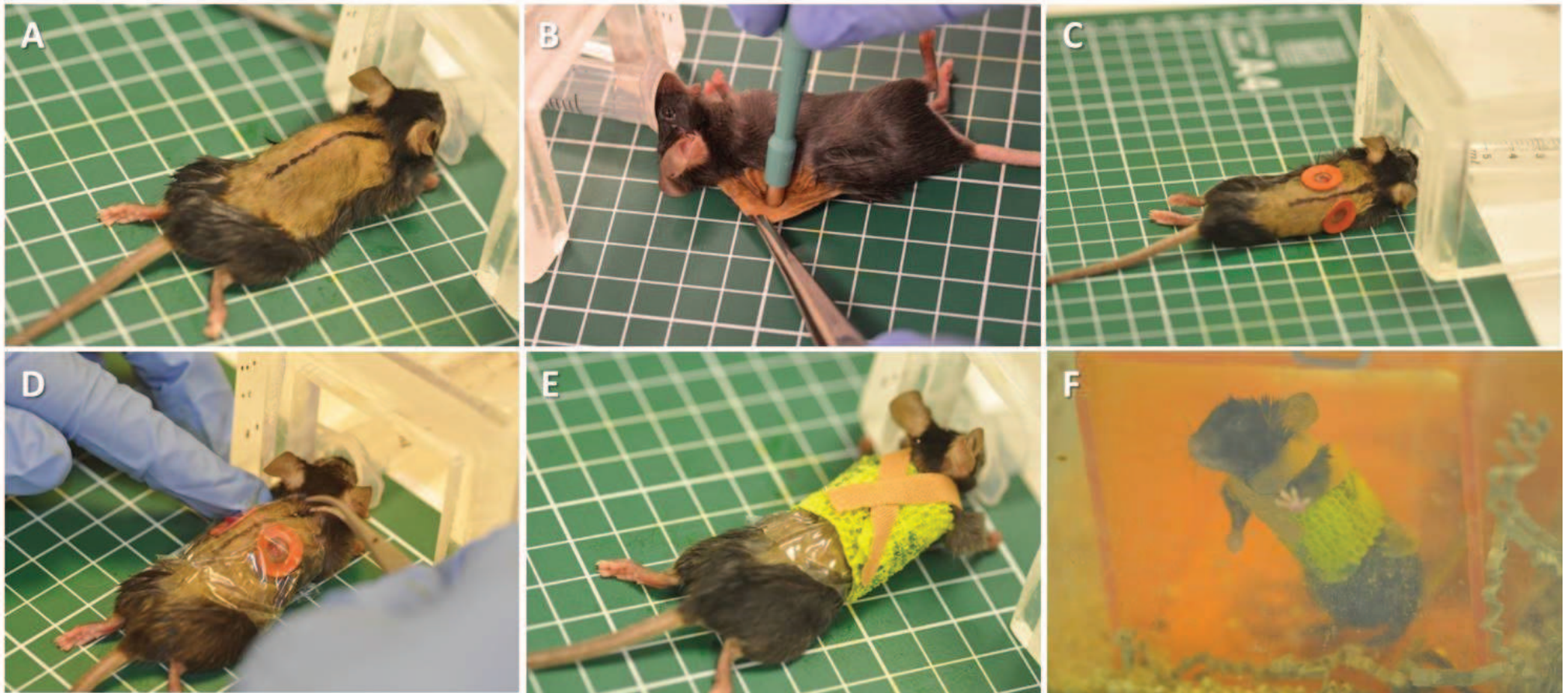
radio-active PIC gels can be located and quantified using a SPECT/CT scanner. This parameter is important, as it is the only reliable method to accurately describe how much gel is still in the wound at specified time points and [REDACTED].

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

Procedure

In this project, we have chosen for the use of the humanized (splinted) full thickness wound model in mice. This model is ideal for our research question for several reasons. First, mice are easy to handle and have quick wound healing. Second, the humanization of the wound by introducing a splint makes the model more comparable to human wound healing. Lastly, full thickness wounds are relatively 'clean' and uncomplicated. This means the wounds will likely heal normally and without complication, making them ideal for studying the effect of our hydrogel wound dressings without interference.

1. The mouse is anesthetized, and then has its dorsal side shaven and disinfected with betadine.
2. The mouse is placed on its side and a fold of dorsal skin is stretched out. A biopsy punch (diameter 4 mm) is used to punch two identical full thickness wounds in the dorsal skin with a single motion. The fresh wounds are photographed.
3. Silicone ring splints may be applied around the wound (thickness 0.5 mm, inner diameter 6 mm, outer diameter 12 mm). These are glued in place using cyano-acrylate tissue glue and will remain there for the remainder of the experiment.
4. In treatment groups, a primary dressing is applied. This is a single topical application of a small volume of thermosensitive gel using a syringe or pipette. A secondary dressing is applied, this consists of a single tegaderm sheet (covers both wounds) and then wrapping the back/belly of the animal in PetFlex bandage. It may then be secured in place with shoulder straps made from petflex or leukoplast tape.
 - 5a. Wounds are allowed to heal for a set period of time, so data may be retrieved at different points during the healing process. We do not plan to keep animals in the experiments for longer than 28 days.
 - 5b. In [REDACTED] groups: new anesthesia moments may occur during which the mouse is imaged or its wound dressing is refreshed/replaced.
 - 5c. In mice that are used for more than 7 days: replacement of the secondary dressing may be necessary when loss of integrity becomes apparent. This requires a new anesthesia moment.
6. At the end of experiment, animals are sacrificed humanely. The wounds are photographed one last time, which will later be useful in determining the size of the wound/scar. Then, the dorsal skin is excised and the (healed) wounds are retrieved by punching them out of the skin sample with a larger biopsy punch (6 mm diameter). The samples are then prepared for histological analysis.



The figure above summarizes the surgical procedure. (A) The animal is shaved and the midline of the dorsal side is marked. (B) By using a biopsy punch, the fold of skin is pierced to create two identical wounds. (C) Silicone ring splints are glued around the wound with tissue glue. (D) A tegaderm sheet is applied around the wound (note: the tegaderm sheet used in this example is slightly too large; a smaller product is available for future use). (E) Petflex is wrapped around the mid section of the mouse and secured in place with shoulder straps (here: made from Leukoplast tape). (F) 7 Days after surgery the mouse is still mobile and capable of reaching up to drink water and eat food, although some mobility is lost (e.g. mice can no longer climb upside down at the ceiling of the cage).

Justification of secondary dressing: It is known that the presence of a bandage wrap around the animal's mid section causes discomfort, and in past studies mice were viewed actively chewing on this dressing and trying to remove it. PetFlex is a specially designed dressing that is self-adhesive (it only sticks to itself) and is resistant to chewing. By applying it firmly, and then securing it in place with additional straps of PetFlex and/or leukoplast

tape it can be ensured that the mouse does not undo its dressing. Natural mice behavior includes thorough cleaning of its body, which includes the back side and any foreign materials (such as the splint). To protect the wound and the primary dressing (i.e. the PIC gel) from the mouse, the secondary dressing needs to be present. To this end, the tegaderm alone does not suffice as mice have been observed chewing on this until it comes loose. Concerns have been raised that the presence of the secondary dressing may influence the results of wound healing. Unfortunately, at this point in research omitting the use of a secondary dressing is not an option. Using mice with splinted wounds and a secondary dressing is the best small animal model that is available, and should provide us with sufficient results to draw conclusions. Later studies (that go beyond the scope of the experiments requested in this DEC) include [REDACTED]. The valid concerns in regards to stress and wound protection offered by the secondary dressings affecting wound healing should be able to be ruled out later during [REDACTED] [REDACTED]). Lastly, it is worthy to note out that current treatments in human also includes the use bandage materials to protect the wound, thus our secondary dressing mimics this in a way.

The secondary dressing may require regular replacement, as wear-and-tear may cause loss of integrity of the dressing. In addition, Tegaderm has an advised limit of 7 days. Thus, the dressing is inspected visually and replaced when deemed necessary. Animals are anesthetized and the secondary dressing is removed carefully to not cause damage or irritation of the skin. During this time, the wounds may be photographed. Depending on the strength of the glue and the quality of the silicone ring splints, these may come loose when the tegaderm removed. They are easily glued back in place with a new application of tissue glue. Then, a fresh sheet of tegaderm is applied and a new layer of Petflex bandage is put in place. This procedure mimics the clinical setting, where dressings also require regular replacement. If dressing replacement does not appear to be required, then we prefer to omit it. If not, then we will aim to refresh it at least every 8 days, or whenever it proves necessary.

[REDACTED]

Experimental groups

Mice be subjected to one of the following conditions:

- 1) An untreated control. Receives only the secondary dressing (to protect the wounds and splints)
- 2) PIC hydrogel (single application).
- 3) PIC hydrogel which [REDACTED] replaced every 2-4 days.
- 4) PIC-In111 hydrogel (for SPECT imaging).

Justification: Group 1 is the control group, and required to place the results of the other groups (primarily group 2 and 3) into context. In group 2, the effect of PIC gel treatment on the wound is investigated for all major phases of the wound healing process. More importantly, this group also serves as an important comparison group for group 3. Moreover, in group 3 the gel is [REDACTED] re-applied, the impact of this procedure on the histological characteristics of the wounds is investigated. Group 2 is thus not only important for identifying the impact of a single gel application treatment, but also to highlight any differences between [REDACTED] (group 3) and [REDACTED]. Lastly, group 4 is crucial

for investigating [REDACTED]. The presence of radio-active PIC gel in the wound [REDACTED] may be quantified and serve as direct measurement for the quantity of gel in the wound.

Pilot studies

Previously, a study was performed (WP 2014-208-009) in which sufficient experience with the wound model and SPECT/CT imaging was obtained. However, we currently do not have experience with keeping mice under these experimental conditions for a period longer than 7 days. Thus, we will first perform a pilot study involving 6 mice. In half of these mice we will apply the primary and secondary dressing to study their integrity for prolonged periods (up to 28 days) (this pilot mimics group 2). In the other half we will practice the dressing replacements proposed for group 3, for up to a maximum of 28 days. In both groups, a mouse is sacrificed at day 14, 21 and finally 28 to assess which time point is most optimal for data collection in the final study. The pilots also serve to identify any unforeseen complications of our experimental setup (dressing integrity, animal wellbeing) beyond 7 days. In addition, we request the use of another 1 to 10 mice to practice and estimate [REDACTED]

[REDACTED] Several *ex vivo* and *in vitro* experiments are already planned to [REDACTED]. However, these models cannot mimic the *in vivo* scenario accurately enough. Thus in these mice full thickness wounds are applied and treated with PIC gel. Several [REDACTED] this gel are practiced that may include protocols with [REDACTED]

[REDACTED] The gel may also be labeled with In-111 (as is explained for experimental group 4) so that [REDACTED]. Knowledge obtained from this pilot will help shape or improve the execution of the complete experiment, and possibly lead to the submission of an amendment to introduce necessary changes.

Data retrieval

Photography will be performed after the wounds are placed, and when the animals are sacrificed.

Later, the size difference between the wounds may be determined to calculate the rate of wound closure. If the protocol allows it (e.g. when dressing changes are included) photographs may also be taken on intermediate days.

Histology is the primary method for data retrieval in this experiment. The harvested wound samples are fixated in formalin and then processed into paraffin sections. Some of the stainings we will perform include:

H&E staining - general structures, and presence of giant cells (hydrogel breakdown response)

AZAN staining - Collagen deposition

F4/80 - Macrophage infiltration

GR-1 - Granulocyte infiltration

aSMA - myofibroblast infiltration and bloodvessel number

Other relevant stainings may later be included, such as ones for determining macrophage phenotype. The number of histological coupes obtained per wound is very high, leaving ample room for additional histological stainings.

For the imaging studies, a SPECT/CT scanner is used to image radio-active In-111 labels. These labels bind to DTPA groups present on the PIC polymer, exactly as in WP 2014-208-009.

Time schedule

Histological study (group 1, 2, 3):

Day 0: Surgery (application of full thickness wounds), treatment with primary (PIC gel) and secondary wound dressing

Day 3: Sacrifice, obtain histological data of inflammatory phase

Day 7: Sacrifice, obtain histological data of proliferation phase

Day 14/21/28: Sacrifice, obtain histological data of granulation phase

█ dressing every 2-to-4 days in group 3.

SPECT/CT imaging study (group 4):

Day 0: Surgery (application of full thickness wounds), treatment with primary (In-111 labeled PIC gel) and secondary wound dressing, imaging with SPECT/CT

Day 3: imaging with SPECT/CT, █, second imaging with SPECT/CT, re-application of primary and secondary wound dressing

Day 6: imaging with SPECT/CT, █, second imaging with SPECT/CT, re-application of primary and secondary wound dressing

Day 9: imaging with SPECT/CT, █, second imaging with SPECT/CT, sacrifice, harvest of skin for histological data, dissection of mouse for bio-distribution measurement.

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

The necessary sample size per group will be calculated according to the requirements set by the CDL animal facility of the Radboudumc, in Nijmegen, the Netherlands. To this end, experience and data from the previous PIC gel animal studies, as well as literature, will be consulted. By performing a statistical power analysis, we can ensure the bare minimum number of animals are used to achieve our goals.

The sample size can be calculated with Piface statistical analysis software. A two-sample t-test will be employed using data from our previous studies. The difference in mean value and standard deviation of certain wound healing parameters (e.g. wound size in square millimeter, or myofibroblast influx score) can be entered. The group size is also entered, and the statistical power is observed. By adjusting the mean difference, standard deviation, or group size we can see what values are required to achieve a statistical power of 0.8 (the generally accepted minimum requirement). From these values, an optimal group size is selected in which the required mean difference and standard deviation are plausible. Plausibility is achieved in two ways: (1) the values must be achievable, and thus be in comparable value ranges as was observed in previous studies, and (2) the values must be credible, e.g. a significant difference in collagen content of 25% is more plausible than a significant difference of only 2.5%.

Due to the nature of our experimental method, each mice carries two identically sized full thickness wounds. By performing specific statistical analysis, these wounds may be paired up to increase the statistical power. This can lead to a reduction in group size, reducing animal suffering by using a lesser amount of animals in total.

B. The animals

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

Choice of animal model:

Mice were selected as most optimal animal model for the following reasons:

- Relatively quick wound healing allows us to keep animals in experiment for a shorter period of time
- Small size limits material costs and allows easier handling in SPECT/CT scanners
- Literature on mouse wound healing is plentiful
- Many research tools (such as antibodies) are more easily available for mice

Regarding animal strain, the typical laboratory mouse strain C57BL/6n was previously used in these kinds of studies, as its sturdy nature helps in reducing failure rate. However, due to the presence and regrowth of hair we found that these animals are less optimal for applying the bandage and for processing histological results. The use of hair clippers, a razor or epilating cream is also undesired, as it may alter the morphology of the skin and the wound healing process. Thus we performed a literary research and found that the SKH-1 mouse line, offered by Charles river registered breeder, is a good candidate for our studies. This mouse is completely hairless but still immuno competent, thus completely avoiding the problems of hair and shaving. Due to the lack of hair follicles, it was found that the epidermis is slightly thicker and therefore resembles the human skin morphology more closely [1]. In addition, it is written that similarly to humans, follicular keratinocytes in SKH-1 mice are not actively playing a part in wound repair process (in particular re-epithelialization). Lastly, the SKH-1 mice has been described as relatively docile and is less likely to remove and become agitated from its wound dressings. For these reasons, the breeder recommends the SKH-1 strain for wound healing studies. Use of a hairless model such as the SKH-1 mouse will allow us to omit the shaving steps mentioned in the animal procedures.

In regards to gender, previously single gender studies were often employed by our group. Our preference goes to using males only, as hormone balance may play an important part in wound healing and is less fragile in males. Furthermore, it has been written that male mice have a thicker dermis, while female mice have a thicker epidermis and hypodermis [2]. This discrepancy in skin thickness may lead to problems when interpreting the histological data, and thus we prefer to avoid mixed gender studies.

Another good animal model for wound healing studies is the pig. The skin of the pig morphologically resembles that of humans. In addition, the pig has ample skin available in non-crucial locations (i.e. a large dorsal side) and is a robust animal. The dutch burnwound foundation is involved in the performance of such studies, and have experience with applying both burn wounds and scalds to the pig model.

[REDACTED] We currently have only minimal knowledge of the influence of PIC gels on wound healing, and this knowledge is limited to 7 days. Moreover, [REDACTED]. Indeed, the mice is a superior choice for such studies, as positioning the animal inside the scanner is significantly easier. [REDACTED].

Estimation of animal numbers:

The maximum number of animals may be calculated by using a simple estimation method:

Pilot mice (maximum): 16

Number of experimental groups: 3 (histology) + 1 (SPECT/CT)

Estimated maximum group size (histology): 6

Estimated maximum group size (SPECT/CT): 10

Number of time points (histology): 3

Total = $16 + (3 \times 6 \times 3) + (10 \times 1) = 80$ mice

We don't expect to see a lot of failures, and if they do occur we expect no more than 10%. We expect these failures to be mainly caused by premature deaths (e.g. during anesthesia) or collection of data (e.g. mistakes during harvesting and processing of histological data).

$80 / (1 - 0.1) = 80 / 0.9 = 89$ mice will be used at most (rounded up).

References:

1. Bell RR, Dunstan RW, & Khan NK (2007) Skin wound healing in the SKH-1 female mouse following inducible nitric oxide synthase inhibition. The British journal of dermatology 157(4):656-661.
2. Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, & Gurtner GC (2011) Surgical approaches to create murine models of human wound healing. Journal of biomedicine & biotechnology 2011:969618.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	Registered Breeder	89	Skeletally Mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

Currently, a good model for studying wound healing outside of the body is not available. The wound repair process relies on numerous factors, such as the delivery of cells and nutrients by the blood, that can not be modelled accurately in an *in vitro* setting. Therefore, animal experiments are required to gain insight in the behaviour of the PIC hydrogel and discover any possible negative responses before moving on to human subjects.

Reduction

To calculate appropriate sample sizes, a statistician will be consulted to oversee the power calculations. In addition, by introducing two wounds per animal the statistical power is increased and the total number of animals put into experiment may be lowered.

Refinement

As it is believed that animals of limited cognitive capacity endure less suffering from painful procedures as more advanced animals. Among mammals, the mouse fits this criteria and also poses several other beneficial characteristics. Wound healing is relatively quick in this species, reducing the time required for the experiment. In addition, many tools and literature sources are available for mouse studies, increasing the success rate and quality of the study. Lastly, we always try to obtain the carcasses of already sacrificed animals (from other studies) so that we may practice new techniques. This way, we can reduce our failure rate in our own study.

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

Whenever animals are handled for experimental reasons, namely surgery, dressing changes, or SPECT/CT imaging, they are anesthetized using an evaporated isoflurane and air mixture. Pain medication (analgesia) will also be administered after surgery according to the rules and regulations set by the CDL animal facility, Nijmegen, the Netherlands. Mice are housed individually to avoid fighting between littermates and to prevent damage to the healing wounds. In addition, it is worthy to note that our experimental conditions are considered wound dressings and may help in the treatment of the applied wounds.

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.

So far, the only animal experiments involving the use of PIC hydrogels as wound dressings have been performed by our own group (RU-DEC 2013-138 (WP 140285) and WP 2014-208-009), as the right to perform these experiments is exclusive to our consortium. The experiments proposed here include several optimizations and extra conditions to make them distinctly different from the previously performed studies. The most notable changes are listed below.

RU-DEC 2013-138 (WP 140285): We now use splinted wounds, whereas the wounds from this study were unsplinted. A secondary dressing is now included to protect the gel from outside factors, such as the mouse itself. An additional time point is included beyond 7 days to investigate the state of wound repair during the granulation phase. And lastly, we now have groups where [REDACTED] to study the effects of wound dressing replacement.

WP 2014-208-009: The current study is a continuation of the imaging study involving In-111 labeled PIC-DTPA. We will now attempt to image wounds [REDACTED], repeatedly over a course of 9 days. Previously, the experiment was limited to 7 days, and the [REDACTED] procedures was not investigated.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

G. Location where the animals procedures are performed

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Both analgesia and anesthesia will be provided and used according to the rules and regulations set by the CDL animal facility, Nijmegen, the Netherlands. Anesthesia is used for all experimental procedures (surgery, dressing changes, imaging), while analgesia is only supplied during/after surgery.

Anesthesia method: Inhalation technique using a mix of evaporated isoflurane and air (induction at 5% ET and maintenance at 2 to 3 % ET).

Analgesia method: Injection with Rimadyl (5 mg/ml, 1 ml/kg) prior to surgery is recommended, with another dose injected 12 to 24 hours post surgery. It is known Rimadyl may affect the inflammatory phase of wound healing and this has an influence on our scientific results. However, we think the animals may benefit from pain medication, and this scenario also resembles a clinical setting in which a patient is giving pain medication after obtaining an injury.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Itching, reduced mobility, stress, discomfort, social isolation.

Explain why these effects may emerge.

Stress is caused by handling, as well as the secondary dressing being constantly in place for the course of the experiment. Anesthesia moments may also result in stress. The presence of wounds not only causes pain, but may also result in itches. Mice have reduced mobility as the result of the secondary dressing, and may be limited in their natural behavior (such as grooming). Mice are housed individually and the resulting social isolation may cause discomfort.

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

To limit the stress induced by the secondary dressing, we will try to apply it carefully and ensure it is tight enough to not become undone, but still loose enough to limit pressure on the mouse's body. In addition, the location for the wounds is chosen specifically to cause minimal discomfort to the animal when its awake (namely, the dorsal skin). Regular checkups by the researchers and biotechnicians are performed to detect any changes in behavior, stress, discomfort, or experimental problems. Lastly, while individual housing is done primarily to protect the wounds from outside influences, it also prevents stress and damage related to fighting between littermates. It is also a pre-emptive countermeasure, as we suspect littermates may seriously influence the wounds (as well as ingest part of the tegaderm or the ring splints) when a dressing of a cagemate becomes undone (by accident).

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The general humane endpoints of RU apply (see intranetsite of animal welfare officers/lvD). In addition, the following experiment specific humane endpoints will be followed:

-Lack of food and water intake, leading to weight loss or dehydration. If stress and pain levels are too high, the animal may omit feeding. It may also be possible for the secondary dressing to be applied too tightly, preventing the mice from reaching the water and food. Regular weighing should be performed (such as when the mice are being handled for the experimental conditions). A body weight reduction of <15% within 2 days or <20% total is considered significant.

-Severe infection of skin defects. Visual defects that severely compromise wound integrity and/or increase wound size. May be observed when the secondary dressing is replaced.

Indicate the likely incidence.

We expect it is unlikely a humane endpoint will be reached. From past experiences, we noticed the full thickness dermal wounds do not bleed under normal circumstances (unless a larger bloodvessel was hit, and even then the bleeding is minimal). The wounds are properly treated with a wound dressing and are thus unlikely to cause complications. The highest risk lies with the animal's response to the secondary dressing. Thus, the behavior of the animals needs to be carefully monitored so we can intervene at the right moment.

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).

Induction and recovery from anesthesia, as well as the initial surgery, is considered a moderately discomforting procedure. However, the combined discomfort of the wounds, ring splints, secondary dressing, and individual housing results in severe discomfort. Some groups of animals will have to live under these conditions for up to several weeks. During this time, the pain of living with wounds will fade (as the wounds naturally heal) and discomfort may lower. On the other hand, the discomfort of the secondary dressing will persist until the end of the experiment. New anesthesia moments (e.g. ████████████████████) are considered moderately discomforting, but will contribute to the overall severely discomforting conditions.

On the final day of the experiment, animals are sacrificed humanely according to CDL protocol. To this end, suffocation with a CO2/O2 gas mixture is the preferred method. This is a non-recovery procedure. This step is performed without anesthesia, unless the animal was already anesthetized for other reasons (e.g. sacrifice at the end of a planned SPECT/CT imaging session).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Histological characterization of the skin wounds is the main method for data retrieval in this study. Thus, animals are required to be sacrificed in order to retrieve the skin/wound sections.

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

Ook acht zij de wetenschappelijke kwaliteit nog steeds beneden het gewenste niveau, zoals blijkt uit onderstaande fundamentele vragen en opmerkingen. De commissie kan niet positief adviseren over de huidige aanvraag.

Zij verzoekt de onderzoekers met klem nogmaals te overwegen of de keuze voor dit diersmodel wel een juiste is. Indien zij toch op deze weg willen doorgaan zullen zij een zorgvuldig geschreven en goed doordachte definitieve aanvraag in moeten sturen waarin recht wordt gedaan aan alle onderstaande punten.

Antwoord: Het project proposal (PP) is herschreven naar aanleiding van de algemene opmerkingen van de DEC. De aanpassingen in de PP worden hieronder eerst opgesomd, en daarna wordt op de specifieke vragen van de commissie ingegaan.

Aanpassingen PP:

- 3.1 Background: De volgorde is aangepast zodat het klinisch probleem beter (en als eerste) aan de orde komt. Er zijn nieuwe alinea's toegevoegd die bijvoorbeeld de frequentie en problematiek van brandwonden aanduiden, of die het innoverende product vergelijken met bestaande producten. Oude alinea's zijn herschreven om het bericht duidelijker over te brengen. Er zijn extra literatuurreferenties toegevoegd om het onderzoek te ondersteunen, alsmede twee figuren die respectievelijk het klinisch probleem illustreren en door ons behaalde resultaten van in vitro cytotoxiciteit studies laten zien.

- 3.2 Purpose: Het einddoel van het totale project wordt gepresenteerd, waarna de specifieke doelen van de huidige studie vermeld worden. Wij hebben gepoogd uit te leggen waarom die doelen relevant zijn voor het hoofddoel en wat wij gaan doen om deze specifieke doelen te halen.

- 3.3 Relevance: Dit onderdeel is opnieuw geformuleerd om de klinische, economische, en wetenschappelijke relevantie beter aan te geven.

-3.4.1 Research strategy: De eerste alinea is grotendeels onveranderd gebleven. Wij hebben vervolgens een nieuwe alinea toegevoegd waarin onze keuzes voor dit wond- en dit diersmodel worden uitgelegd. In onderdeel 2A van de DAP wordt tevens het wond- en diersmodel nogmaals verantwoord en worden er meer details gegeven waarom wij deze keuzes hebben gemaakt.

- 3.4.2 Outline: De opzet van de groepen en de formulering van de bestaande alinea's zijn aangepast. Groep 5 is komen te vervallen, de huidige studie zal zich enkel focussen op de

[redacted]. Tevens zijn 2 pilot-experimenten uitgedacht en beschreven (in dit onderdeel en ook in de DAP).

-3.4.3 Coherence: Er wordt nu eerst per experimentele groep gemeld waarom die groep relevant is voor het beantwoorden van de hoofdvraag. Het go/no-go moment dat in onderdeel 4 bestaat tussen de tijdstippen wordt apart uitgelegd. Ook wordt het doel van de twee pilot-experimenten uitgelegd en waarom deze belangrijk zijn voor het verloop van de hoofd experimenten.

Project Proposal:

-3.1: De huidige stand van zaken wat betreft hydrogels die gebruikt kunnen worden om wonden af te dekken is onvoldoende gepresenteerd.

Er bestaan kennelijk al (thermosensitieve) hydrogels die gebruikt kunnen worden om wonden af te dekken: uit de bijlage blijkt dat de PIC hydrogel vergeleken zal worden met de 'thermoreversible Matrigel'.

De noodzaak voor het onderzoeken van juist deze PIC hydrogel is onvoldoende duidelijk.

Antwoord: Om het verschil tussen huidige wondbedekkers en PIC-gels beter te illustreren zijn een aantal positieve en negatieve aspecten van de huidige producten opgenoemd in alinea 4

van onderdeel 3.1. In de tweede helft van deze alinea wordt specifiek ingegaan op hydrogels, en wordt er vermeld in welke aspecten PIC-gels zich differentiëren van deze gels. Hiervoor zijn nieuwe literatuurreferenties toegevoegd.

De vergelijking met andere producten, zoals Matrigel, maakt niet langer deel uit van het in vivo onderzoek. Zoals de commissie heeft voorgesteld; ligt de focus nu enkel op het [REDACTED] onze eigen ontwikkelde PIC gel, en op het effect van langdurige blootstelling. Voorheen werd Matrigel genoemd omdat het een alom gebruikte thermoreversible hydrogel is (voor cell culture en dierstudies). Echter wordt deze geogst in een tumorcellijn, waardoor er veel batch-to-batch verschillen ontstaan en het gebruik in mensen wordt afgeraden. In onderdeel 3.1 wordt nog wel een vergelijking met Matrigel gemaakt met betrekking tot cytotoxiciteit (fig. 2), om aan te tonen dat onze PIC-gel vergelijkbaar is met een vaak gebruikt product dat niet toxisch is. Om de uniekheid van PIC-gel beter aan te duiden wordt in paragraaf 4 van onderdeel 3.1 het werk van Zeng et al. gemeld. Deze onderzoekers werken ook aan een thermosensitieve hydrogel voor gecompliceerde wonden, maar gebruiken een materiaal met een volledig omgekeerde temperatuurgevoeligheid (namelijk een gel die geleerd bij afkoeling, niet bij opwarming). In paragraaf 4 en 5 wordt nu verder ingegaan op de positieve eigenschappen die PIC-gels mogelijk bieden als wondverband. Wij willen benadrukken dat huidige behandelingsmethoden niet optimaal zijn omdat veel (brandwonden) patiënten nog steeds last hebben van permanente littekens of andere problemen. Onderzoek naar nieuwe behandelingsmethoden is dus gewenst. PIC-gel is een nieuw product wat de potentie heeft om deze niche vervullen. Wij hebben daarom ook geprobeerd de focus te leggen op het grote aantal positieve eigenschappen die worden aangeboden door de PIC gel, in vergelijking tot de huidige generatie concurrerende producten. Daarvan is [REDACTED] een belangrijke eigenschap, want dat kan mogelijk leiden tot [REDACTED].

-3.1: Het klinische probleem is onvoldoende belicht en is, op deze wijze gepresenteerd, niet het uitgangspunt van de studie. De indruk wordt gewekt dat er wordt gezocht naar klinische toepassingen voor de gel: er wordt een probleem gezocht bij een gel, terwijl het klinisch probleem centraal dient te staan. Waarom is een wondbedekker nodig? Waarom zijn de huidige middelen niet adequaat? Hoe groot is de behoefte aan nieuwe middelen die beter werken? Er is een grote hoeveelheid literatuur over 'hydrogel wound dressing' welke onbenoemd blijft.

Antwoord: Onderdeel 3.1 is opnieuw gestructureerd zodat de klinische probleemstelling centraal staat en de achtergrond inleidt. Wij beginnen nu met een uitleg waarom brandwonden vaak in complicaties resulteren (alinea 1). Vervolgens presenteren wij de frequentie van brandwonden, en welke bedragen aan zorgkosten er doorgaans gepaard gaan met de behandeling van dergelijke wonden (alinea 2). Gezien de hoogte van deze bedragen en het feit dat brandwondenpatiënten veel pijn ervaren tijdens het behandelen van hun wonden, en desondanks nog bijna altijd littekens krijgen, stellen wij dat er nieuwe behandelingsmethodes gewenst zijn. Na ons eigen product te introduceren (alinea 3) maken wij een vergelijking met huidige producten (alinea 4), en leggen wij de nadruk op waarom PIC-gels makkelijker te hanteren zijn en de redenen waarom het mogelijk minder pijnlijk is. Daarnaast bezitten PIC-gels de potentie om het genezingsproces te verbeteren en mogelijk permanente schade en littekens te voorkomen. Toekomstig verder onderzoek zal zich hier met name op gaan richten.

- 3.1: De commissie is niet onder de indruk van de resultaten van het beschreven voorwerk. De eerste studie [REDACTED] terwijl de tweede, zeer beperkte,

studie uitwees dat [REDACTED]. De commissie vraagt zich af hoe deze resultaten als veelbelovend kunnen worden gezien. Zij lijken er eerder op te duiden dat de gezochte positieve eigenschap (makkelijk te verwijderen en opnieuw aan te brengen) een illusie zal blijken.

Antwoord: In onze ogen waren de voorgaande studies juist veelbelovend over het gebruik van PIC-gel als wondbedekker. Wij hebben gezien dat [REDACTED]. De SPECT/CT-studie wees vervolgens uit dat [REDACTED]. Wat wij hier mee willen aangeven is dat de gel [REDACTED]. Wat betreft het verwijderen van de gel: hier is nog geen onderzoek naar gedaan. Wij hebben enkel uit de vorige studie geconcludeerd dat [REDACTED] nu juist één van de hoofddoelen van de huidige studie. Tevens is er op basis van de huidige resultaten [REDACTED]. Om dat te bevestigen wordt in deze studie dan ook een tijdpunt van 14 dagen of later geïncludeerd om langdurige blootstelling te onderzoeken.

-3.4.2: De strategie is nog niet goed doordacht en het feitelijke verloop van het experiment lijkt afhankelijk te worden gesteld van de beschikbaarheid van 'tools' en mensen (p8, regel 1). De commissie acht dit ontoelaatbaar. Een onderzoeksprotocol dient te worden opgesteld op basis van wetenschappelijke overwegingen. De commissie is van mening dat proefdieronderzoek zorgvuldig gepland dient te worden en vervolgens ook exact zo uitgevoerd dient te worden.

De onderzoekers bestuderen deze gel al sinds 2013 in proefdieren. Uiteindelijk heeft dit geresulteerd in een model met ernstig ongerief doordat het nodig blijkt een splint te plaatsen en de romp van de muis volledig in te pakken, waardoor de muizen ook individueel gehuisvest moeten worden. Het design van deze experimenten dient dan ook zeer goed doordacht te zijn. Die vereiste zorgvuldigheid komt niet tot uiting in deze projectaanvraag. Ook wordt onvoldoende duidelijk waarom dit niet in een minder belastend diermodel, bijvoorbeeld in een varken, onderzocht kan worden.

Antwoord: Wij hebben een aanzienlijke tijd besteed aan het opstellen van de experimenten en het optimaliseren van de experimentele parameters met de huidige kennis. Met de beschikbaarheid van tools refereerden wij specifiek naar de beschikbaarheid van de SPECT/CT-scanner (welke ook door andere onderzoekers gebruikt wordt en soms onderhoud nodig heeft) en de beschikbaarheid van biotechnici in het dierenlab. Dit diende enkel als illustratie van het type overwegingen die gemaakt moeten worden bij de uitwerking en inplanning van het werkprotocol. Om verwarring te voorkomen is het grootste deel van onderdeel 3.4.2 herschreven. Tijds punten worden nu specifiek benoemd en beschreven (zo ook in onderdeel 2A van de DAP). Tevens worden twee pilotstudies beschreven die wij relevant vinden voor de optimalisatie van onze experimentele opzet. Wij hopen hier mee aan te tonen welke wetenschappelijke overwegingen wij maken om de kwaliteit van onze studie te verbeteren.

Betreffende het diermodel en de mate van ongerief: wij hebben extra verduidelijking toegevoegd waarom wij voor deze studie muizen willen gebruiken, i.p.v. bijvoorbeeld varkens. Dit doen wij in onderdeel 3.1, 3.4.1, en onderdeel B van het DAP. Hierbij speelt de afmeting van muizen de belangrijkste rol; wij zijn ervan overtuigd dat condities zoals [REDACTED] beter

gehanteerd kunnen worden in kleine dieren. Tevens zijn varkens te omvangrijk om praktisch te hanteren in een SPECT/CT-scanner en hebben wij reeds ervaring met muizen in deze aanpak. Wij hopen met alle aanpassingen dat in de huidige versie wel naar voren komt dat er goed over de experimentele design is nagedacht.

Description of Animal Procedures:

-A: De noodzaak voor het gebruik van de verschillende onderzoeksgroepen is onvoldoende onderbouwd. Groepen 4 en 5 lijken onnodig om het gewenste doel, het aantonen dat het vervangen van de gel mogelijk is zonder negatieve gevolgen, te behalen.

De vier tijdstippen dienen te worden onderbouwd: is het verstandig een groep van 4 weken te includeren terwijl de, beperkte, huidige ervaring stopt bij 1 week? Voor iedere groep van 6 muizen dient duidelijk en voorafgaand aan het experiment te worden vastgelegd wat zij op welk tijdstip dienen te ondergaan. Dit geldt in het bijzonder voor tijdstippen en frequentie van de vervanging van de gel. Dus níet zoals op p8 van het project proposal wordt gesteld: 'we speculate this step should occur every 3 days or twice per week'. Ook de momenten waarop de secundaire dressing wordt vervangen dienen van te voren worden vastgelegd. Alle handelingen die bijdragen aan het ongerief (aard en frequentie van de handelingen) dienen in deze aanvraag te worden vermeld.

Antwoord: Wij hebben na advies van de commissie de experimentele groepen aangepast. Groep 5 is komen te vervallen en tevens hebben wij besloten dat één tijdstip voorbij 14 dagen voldoende is om conclusies te trekken over de impact van PIC-gel op de lange termijn. Om een beter beeld te krijgen van het histologische uiterlijk van de wond op dag 14, 21 en 28 wordt een pilotexperiment uitgevoerd waarbij dieren op die dagen worden opgeofferd. Hieruit moet blijken welk tijdstip uiteindelijk optimaal gaat zijn voor het beoordelen van wonden in de granulatie fase (laatst fase van wondgenezing) in de hoofdstudie. Tevens is er een pilot groep beschreven voor [REDACTED]. Er is een tijdslijn toegevoegd voor groep 1, 2 en 3 en een aparte voor groep 4. Voor [REDACTED] melden wij een tijd bereik van 2 tot 4 dagen. Door het uitvoeren van een pilotstudie kunnen we dit bereik verder specificeren (b.v. elke 3 dagen), maar biedt het ons alsnog flexibiliteit mocht dit nodig zijn. De frequentie van het vervangen van de secondary dressing wordt nu in onderdeel 2A uitgelegd.

-K: Het cumulatief ongerief is ernstig voor alle dieren: zij worden ingepakt en individueel gehuisvest.

Antwoord: Na overleg met de commissie hebben wij besloten cumulatief ernstig ongerief te hanteren, dit is in de DAP (onderdeel K) en de NTS (onderdeel 3.5) aangepast.

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Het aantal dieren en de ongerief score in de NTS is aangepast aan de hand van de aanpassingen in het PP en DAP.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

- Datum vragen: 08-05-2017

Datum antwoorden: 08-05-2017

Project Proposal:

3.4.1: De aanvragers vermelden aan het eind van deze paragraaf: 'Future studies, that will be designed and performed based on the results obtained in the current study, will include [REDACTED].' De DEC leidt hieruit af dat [REDACTED] pas zullen worden uitgevoerd als de resultaten van de voorliggende studie bekend zijn. Kunnen de aanvragers bevestigen dat dit juist is?

Antwoord: Dit betreft [REDACTED] die zullen worden uitgevoerd door de Vrije Universiteit Medisch Centrum Amsterdam. Deze studie legt de focus op [REDACTED]. De onderzoekers in Amsterdam wachten inderdaad op ons advies over het hanteren van de gel. Dit advies [REDACTED]. Dit laatste wordt in de huidige studie (DEC 2016-0103) onderzocht. De onderzoeksgroep in Amsterdam zal dan ook niet met hun studies beginnen totdat zij onze bevindingen over het gebruik van en reactie op de gel hebben ontvangen.

- De antwoorden hebben niet 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. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project van beperkte omvang. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is te onderzoeken of PIC hydrogels bruikbare wondbedekkers zijn, waarbij de aanvrager focust op het effect dat deze hydrogel heeft op de verschillende stadia

van het wondgenezingsproces, en op de vraag of de hydrogel [REDACTED] [REDACTED]. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een hydrogel die de wondgenezing ondersteunt en minder pijn en beschadiging van het wondbed veroorzaakt bij het verwijderen. PIC hydrogels hebben unieke eigenschappen waardoor zij een goede wondbedekker zouden kunnen zijn. Wanneer blijkt dat de PIC hydrogel inderdaad [REDACTED] [REDACTED], dan zal deze gel in vervollexperimenten verder worden onderzocht. De onderzoekers denken daarbij [REDACTED] [REDACTED]. De DEC is van mening dat er binnen dit project nog geen directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van de toepasbaarheid van PIC-hydrogels voor toepassing als wondbedekker nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe wondbedekkers die het genezingsproces minder verstoren en makkelijker vervangen kunnen worden, en dat er met name behoefte is aan dergelijke wondbedekkers voor de behandeling van brandwondenpatiënten. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor patiënten is dit onderzoek indirect van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe wondbedekkers die het genezingsproces beter ondersteunen en makkelijker vervangen kunnen worden. Met name brandwonden patiënten zouden hierbij gebaat kunnen zijn, omdat het een vermindering van littekenvorming zou kunnen betekenen en de wondverzorging minder pijnlijk zou worden. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor brandwondenpatiënten, is van groot belang voor de samenleving.
6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn niet conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden individueel gehuisvest, hetgeen noodzakelijk is voor het slagen van de experimenten. De dieren kunnen elkaar wel zien, horen en ruiken. De DEC is van mening dat er voldoende reden is voor individuele huisvesting, en dat de aanvrager er alles aan doet om het ongerief van individuele huisvesting zoveel mogelijk te beperken.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt vooral veroorzaakt door het aanbrengen van de folie rondom de romp om te voorkomen dat de muis de gel verwijdert. De commissie is van mening dat dit in combinatie met de overige handelingen en individuele huisvesting leidt tot ernstig ongerief voor de dieren.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het aanbrengen van de siliconen spalken op de rug, die noodzakelijk zijn om de aangebrachte wonden open te houden. Om te voorkomen dat het dier de gel uit de rugwonden likt wordt folie rondom de romp aangebracht. Het dier wordt hierdoor gehinderd in zijn normale gedrag en de zelfredzaamheid neemt af. Er zullen haarloze muizen gebruikt worden, omdat hun huid meer op de huid van mensen lijkt en hun huid niet geschoren hoeft te worden voor de experimenten. De integriteit van deze dieren is aangetast, omdat zij geen vacht hebben.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met dit diermodel ingeschat. Op basis daarvan kan gezegd worden dat het onwaarschijnlijk is dat een dergelijke situatie zich zal voordoen. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Wondgenezing is een complex proces waarbij verschillende factoren, zoals cellen en nutriënten uit het bloed, betrokken zijn. Er is nog geen goed proefdiervrij alternatief beschikbaar om wondgenezing te bestuderen.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog

een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit pilots worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De huid van een muis komt voldoende overeen met menselijke huid, waardoor de resultaten van wondgenezing vertaald kunnen worden naar de humane situatie. De dieren zullen met name veel ongerief ondervinden van de folie die rondom de romp wordt aangebracht. Dit is echter onvermijdelijk om het doel van dit project te bereiken. De DEC heeft expliciet gevraagd naar de mogelijkheden om een groter diermodel, zoals het varken, te gebruiken waarbij het niet nodig is om de romp van de dieren in te pakken. De DEC is er van overtuigd dat dit voor het huidige onderzoek praktisch niet realiseerbaar is. Voor de handelingen waarvoor dit vereist is, zullen de onderzoekers adequate pijnstilling geven. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: 'De voorkeur gaat uit naar het gebruik van alleen mannelijke dieren, omdat hormoonbalans een belangrijke rol in wondgenezing zou kunnen spelen. Bovendien verschilt de huidopbouw tussen mannelijke en vrouwelijke muizen, waardoor er problemen zouden kunnen ontstaan bij het interpreteren van de histologische data. Daarom willen we liever geen studies met beide geslachten doen.' De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om het huidweefsel te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een ernstige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken. Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van

hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Ernstige littekenvorming, zoals die bijvoorbeeld kan ontstaan bij de genezing van brandwonden, kan leiden tot functiebeperkingen van ledematen en kan grote psychologische effecten hebben. De resultaten van dit project zullen duidelijk maken of de onderzochte nieuwe wondbedekker het wondgenezingsproces beter kan ondersteunen en eenvoudiger te vervangen is. De commissie acht het ontwikkelen van nieuwe wondbedekkers die de wondgenezing beter ondersteunen van substantieel belang. Deze experimenten leveren daaraan naar het oordeel van de commissie een beperkte, maar noodzakelijke, bijdrage door uitsluitel te geven over de vraag of deze hydrogel daarvoor een geschikte kandidaat is.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling: onderzoeken of PIC hydrogels bruikbare wondbedekkers zijn. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een hydrogel die de wondgenezing ondersteunt en minder pijn en beschadiging van het wondbed veroorzaakt bij het verwijderen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- X Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- o Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- o Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- o De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- o De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- o De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

T.a.v. [REDACTED]

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171825

Bijlagen

2

Datum 23 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 mei 2017. Het gaat om uw project "PIC hydrogels for wound dressing purposes". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020171825. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

23 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171825

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171825

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postbus: [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171825

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

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

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2017
Geplande einddatum: 1 juni 2021
Titel project: PIC hydrogels for wound dressing purposes
Titel niet-technische samenvatting: Het karakteriseren van nieuwe vloeibare pleisters
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171825

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 23 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Instantie voor dierenwelzijn

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171825

Bijlagen

2

Datum 23 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 mei 2017

Vervaldatum: 22 juni 2017

Factuurnummer: 171825

Ordernummer: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020171825	€ 1035,-

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.

- U geeft in uw aanvraag aan van plan te zijn alleen mannelijke dieren te gebruiken. U geeft aan dat de huidopbouw van mannelijke en vrouwelijke dieren verschillend is en dat dit kan leiden tot problemen bij de interpretatie van histologische data. Kunt u aangeven op welke wijze dit zou leiden tot problemen en of het gebruik van beide geslachten ook zou leiden tot een toename van het benodigd aantal dieren. Mocht u van mening zijn dat het gebruik van beide geslachten zou leiden tot een toename van het aantal dieren, dan wordt u verzocht aan te geven waaruit dit blijkt.

Antwoord:

In onze aanvraag worden twee redenen gegeven voor het gebruik van uitsluitend mannelijke dieren. De eerste reden betreft de invloed van hormonen. Het is bekend dat vrouwtjes gevoeliger zijn voor fluctuaties in de hormoonspiegel dan mannetjes. Het is niet ondenkbaar dat het ongerief en stress die door het experiment worden veroorzaakt de hormoonspiegel kunnen beïnvloeden. Aangezien bepaalde hormonen, zoals oestrogeen, de wond genezing kunnen beïnvloeden is het beter om zo veel mogelijk fluctuatie hier in te voorkomen [1,2]. Door zo min mogelijk variatie in de dieren te nemen (d.w.z. enkel mannetjes die over het algemeen stabiel zijn), kan de invloed van ons eigen materiaal (en dus het doel van het onderzoek) beter onderzocht worden.

De tweede reden is dat het gebruik van twee geslachten tot problemen kan leiden bij het vergelijken van de resultaten. Onderzoek heeft aangetoond dat de epidermis van vrouwelijke muizen tot wel 40% dikker kan zijn, en de hypodermis maar liefst 1100% [3]. De dermis in mannetjes is daarentegen 190% dikker dan die van vrouwtjes. In ons onderzoek wordt zowel de algemene structuur van de helende wonden onderzocht als de dikte hiervan gekwantificeerd (b.v. het totaal percentage van collageen in de helende huid). Als een van de onderzoeksgroepen vanwege randomisatie bijna uitsluitend mannetjes bevat, en de andere groep bijna uitsluitend vrouwtjes, dan kunnen er verschillen in de hoeveelheid collageen gemeten worden. Deze verschillen zijn dan geattributeerd aan het geslacht van de muizen, en niet aan het effect van onze experimentele condities. Dit probleem kan gemakkelijk worden voorkomen door muizen van hetzelfde geslacht, leeftijd en gewicht te gebruiken.

Vanwege bovenstaande redenen zijn wij van mening dat het gebruik van twee geslachten zal leiden tot problemen bij de interpretatie van de resultaten, en daarmee de kwaliteit van het onderzoek doen afnemen. Daarnaast zal het gebruik van twee geslachten ook leiden tot een toename in het aantal dieren dat voor de proef nodig is. Namelijk, om te compenseren voor variaties in huiddikte die door geslacht geïntroduceerd worden moet de groepsgrootte vergroot worden. Als de groepen groot genoeg zijn, kan men met redelijke zekerheid aannemen dat de distributie van mannetjes en vrouwtjes gelijk is en alle resultaten op een eerlijke manier beïnvloed worden. Het onnodig vergroten van de groepsgrootte is niet gewenst.

1. Ashcroft GS, Dodsworth J, Boxtel EV, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, et al. (1997) Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. *Nat Med* 3: 1209-1215.
2. Hardman MJ, Ashcroft GS (2008) Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome Biology* 9: R80.
3. Azzi L, El-Alfy M, Martel C, Labrie F (2005) Gender Differences in Mouse Skin Morphology and Specific Effects of Sex Steroids and Dehydroepiandrosterone. *Journal of Investigative Dermatology* 124: 22-27.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

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

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171825

Bijlagen

1

Datum 7 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "PIC hydrogels for wound dressing purposes" met aanvraagnummer AVD1030020171825. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 1 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 31 mei 2017 hebben wij u gevraagd het gebruik van alleen mannelijke dieren toe te lichten. Wij kunnen ons vinden in uw toelichting.

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 "PIC hydrogels for wound dressing purposes" starten. De vergunning wordt afgegeven van 7 juni 2017 tot en met 1 juni 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 mei 2017. 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 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).

Datum:

7 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171825

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



M. G. de Peder
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
7 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171825



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres:

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 juni 2017 tot en met 1 juni 2021, voor het project "PIC hydrogels for wound dressing purposes" met aanvraagnummer AVD1030020171825, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student. Voor de uitvoering van het project is verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 mei 2017, ontvangen op 23 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 1 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Full thickness wounds in mice				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	89	100% Ernstig	

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 juni 2022 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.

Aanvraagnummer:
AVD1030020171825

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:

AVD1030020171825

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:
AVD1030020171825

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

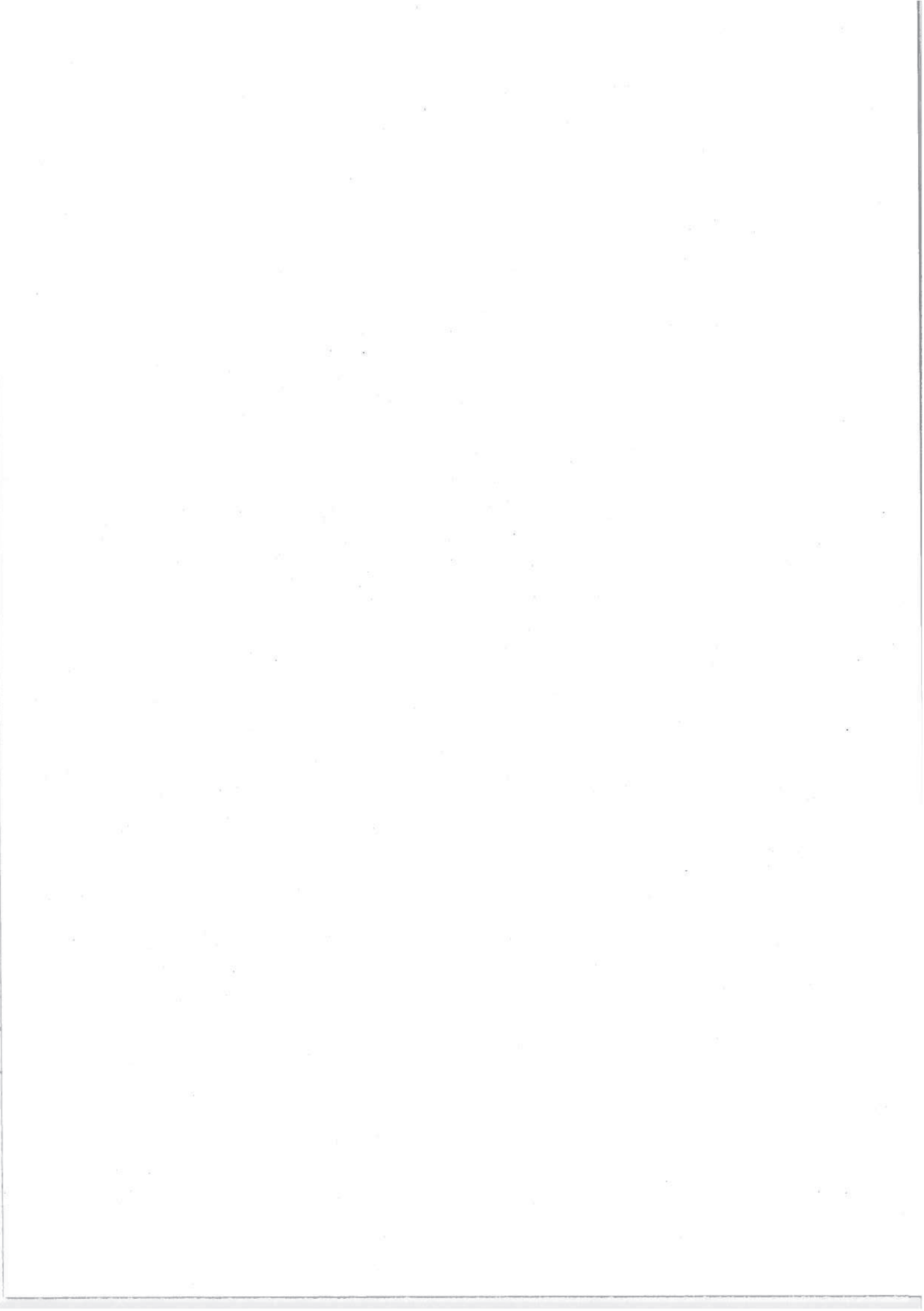
Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.



Inventaris Wob-verzoek W17-11										
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS 20171826	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel									
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x	x	x		
5	DEC advies				x	x	x	x		
6	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x			
7	Adviesnota CCD		x						x	
8	Beschikking en vergunning				x		x			



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > <i>Vul uw deelnemernummer in</i> 10300 <input type="checkbox"/> Nee > <i>U kunt geen aanvraag doen</i>										
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>Instantie voor dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9				
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen											
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn											
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9											
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	[Redacted]	Postbus	[Redacted]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
Straat en huisnummer	[Redacted]											
Postbus	[Redacted]											
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen											
IBAN	NL90ABNA0231209983											
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud											
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	Functie	[Redacted]	Afdeling	[Redacted]	Telefoonnummer	[Redacted]	E-mailadres	[Redacted]
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]											
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" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td style="background-color: black; color: black;">[Redacted]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	Functie	[Redacted]	Afdeling	[Redacted]	Telefoonnummer	[Redacted]	E-mailadres	[Redacted]
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]											
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 | |
| Functie | Instantievoor Dierenwelzijn |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 0 1 . 2 0 1 8 |
| Einddatum | 3 1 . 1 2 . 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Gene-regulatory control of embryonic development
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Hoe genen de embryonale ontwikkeling aansturen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | |
| Postadres | |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,00	Lege
		<input type="checkbox"/> Wijziging €	Lege
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. <i>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.</i>	<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso	
		<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
		<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel
		<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
		Overige bijlagen, indien van toepassing
		<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
		<input checked="" type="checkbox"/> DEC-advies en factuurinformatie

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	2 3 - 0 5 - 2 0 1 7
Handtekening	

**Form
Project proposal**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Gene regulatory control of embryonic development

2 Categories

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

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.
-

Almost any cell in our body has the intrinsic ability to become virtually any other type of cell. From this Nobel-prize winning discovery (2012, Yamanaka and Gurdon) it follows that it should be possible to generate patient-derived cells or tissues to cure or alleviate a range of medical problems. To realize this medical potential in a safe and effective way and to “work with, not against biology”, it is important to understand cellular potency and differentiation in the context of normal embryonic development (Badylak 2016; Gupta 2016). This is the focus in the field of developmental biology, which studies how the fertilized egg or oocyte can develop into a complete body with fully functional tissues and organs. Animal model systems are essential to further our understanding of the developmental origins of congenital disease. Embryos of the amphibian *Xenopus* species, which are the focus of the project described here, represent an excellent non-mammalian model system for development and differentiation (Harland and Grainger 2011). Among the advantages is the external development of the embryos, which makes them experimentally accessible without the need for invasive perturbation, which is a significant advantage both from a practical and refinement perspective. Relatively large numbers of these embryos can be obtained, which readily enables biochemical approaches to gene regulation such as chromatin immunoprecipitation (ChIP) and proteomics analyses [REDACTED]; Gentsch et al. 2013; [REDACTED]). There are also well-developed experimental approaches in this model, including gene perturbation (knockdown, CRISPR-Cas9, overexpression) and embryological manipulations such as microdissection of pluripotent cells of the animal cap. Studies of early embryonic gene function in *Xenopus* have contributed enormously to elucidating the molecular properties and functional roles of genes, including genes involved in human cancer and disease (Hardwick and Philpott 2015; Tandon et al. 2016; Naert et al. 2017; Sater and Moody 2017). Moreover, they have served to provide powerful paradigms in molecular, cellular, developmental and cancer biology. It is a very good model system for exploring molecular mechanisms of gene regulation and for studying the earliest stages of vertebrate embryonic development.

The genomes of both *X.* [REDACTED] (true diploid) and *X.* [REDACTED] (allo-tetraploid) have been sequenced ([REDACTED]). The *X.* [REDACTED] genome has a very similar gene content compared to the human genome and also has maintained a large extent of shared synteny with human chromosomes ([REDACTED]). *X.* [REDACTED] on the other hand has a unique natural history that features a whole genome duplication after interspecific hybridization, making it a very interesting model for genome evolution ([REDACTED]). Interspecific hybridization followed by duplication is common in plants but rare in animals, yet two rounds of whole genome duplication have been inferred at the root of the vertebrate

Ohno S. 1999. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Seminars in cell & developmental biology* **10**: 517-522.

Sater AK, Moody SA. 2017. Using *Xenopus* to understand human disease and developmental disorders. *Genesis (New York, NY : 2000)* **55**.

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 purpose of the animal experiments in this project is to induce egg-laying in female *Xenopus* and obtain embryos through *in vitro* fertilization. The embryos obtained, which are not considered experimental animals by law, are the study objects for analyses of developmental gene regulation. The specific aims of this project are (1) to uncover cellular heterogeneity and stochasticity as well as cellular trajectories in the late blastula and early gastrula embryo by single cell sequencing; (2) to elucidate the transcription factor network and the epigenetic mechanisms underlying pluripotency and germ layer commitment; (3) to uncover the extent to which the early embryonic gene regulatory network has been rewired in the allo-tetraploid frog *X. [redacted]* compared to the diploid frog *X. [redacted]*. These aims will contribute to identifying the molecular mechanisms of gene regulation during the earliest stages of embryogenesis (blastula and gastrula stages) including the onset of zygotic transcription, pluripotency and germ layer commitment.

3.3 Relevance

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

The work described contributes to developing the fundamental knowledge infrastructure of normal embryonic development and differentiation and the gene regulatory processes it involves. This is of crucial importance for profound medical problems including congenital disease, regenerative medicine and cancer.

Scientifically, the work is at the forefront of the endeavors to understand the information encoded in the genome and how it is utilized in development and differentiation. The research explores the as of yet uncharted territory of how gene regulation in development works and how the developmental instructions embedded in genomic information are progressively unlocked in a highly regulated fashion. The applicant has extensive expertise and experience in this research area (experimental methods, computational expertise, animal model system, and scientific area). Research funding has been received by the US National Institutes of Health (NICHD, foreign R01 grant) and the European Union (Coordinator of DevCom, a Marie Curie European training network for Developmental and Computational Biology). The expertise is documented is documented by the applicant's track record [REDACTED] which includes papers in Cell, Nature Communications, Nature Genetics, Developmental Cell and Nature (selected publications of the last five years).

3.4 Research Strategy

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

The objective is obtaining *Xenopus* embryos for experimentation and sample collection. The embryos themselves are not subject to the law on animal experimentation. The animal experiment therefore consists of the procedures to obtain eggs and sperm for *in vitro* fertilization.

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

There are two animal experimental procedures involved in the work:

- Induction of ovulation in *Xenopus* females
- Sacrificing *Xenopus*

The animal experiment involves hormonal stimulation of female *Xenopus* by subcutaneous injection of chorionic gonadotropin. This will induce egg-laying and the resulting eggs can be used to obtain embryos using *in vitro* fertilization (ivf) of eggs. Sperm for ivf is obtained from testes removed from sacrificed male *Xenopus*.

For the scientific experiments the embryos are kept until larval stages (at the latest, typically to blastula or gastrula stages) and are not subject to the law on animal experimentation.

The majority of experiments will be done with *X.* [REDACTED] embryos, but a few experiments will be performed with *X.* [REDACTED] to compare gene regulation in *X.* [REDACTED] with *X.* [REDACTED] and to achieve Aim 3 (cf. Purpose). The specifics for the two species are only subtly different (dosage of hCG), conceptually they are very similar and there is no difference in the level of discomfort.

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

The animal experiments that form the basis of the scientific project have a very simple and coherent structure. The animal procedures in each case are the same: Eggs will be obtained from female *Xenopus* and sperm from male *Xenopus*. This will be done up to twice a week. Individual female *Xenopus* will be part of the animal experiment following the first hCG injection to collect eggs. They will rest for at least three months before being used for egg collection again and are part of the animal experiment for the duration of the project or their unintended death, whichever comes first.

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	Xenopus females for egg production
2	Xenopus males

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

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

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.

Induced ovulation will be used to obtain eggs from female *Xenopus*. The eggs will be fertilized *in vitro*. The resulting embryos will be used to study gene regulation during embryonic development. Egg production is the primary outcome of the experiment.

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

Day 1: Female *Xenopus* [REDACTED] will be injected subcutaneously with a low dose chorionic gonadotropin to pre-prime the oocytes for maturation. This step is not necessary for *X.* [REDACTED] females.

Day 3: Female *Xenopus* will be injected subcutaneously with a higher dose of chorionic gonadotropin (adjusted to the species). Within 3-6 hours the *X.* [REDACTED] female starts laying eggs. For *X.* [REDACTED] this is 12-18 hours. Fresh eggs will be obtained by squeezing (applying gentle pressure to the abdomen).

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

As the scientific experiments focus on embryos (studying Gene-regulatory control of embryonic development), and several hundreds of eggs (100-400) can be obtained from a single ovulating *Xenopus* female, the statistics of animal use (adult females) are mainly based on securing a steady and on-demand supply of eggs. Around 150 embryos are typically required for a single microinjection experiment. For sample collection for ChIP (chromatin immunoprecipitation) 300 embryos are required.

Further considerations are that egg quality is highly variable between individuals, necessitating the use of several females on a given day for egg production. Also, females periodically cease laying eggs. The reasons for this phenomenon are unknown and it commonly affects all individuals in a tank. Although it has often been suggested to relate to seasonal influences, individuals in other tanks are often not affected and the real causes for periodic paucity in egg production remain unknown. Typically the frogs resume egg laying after several months (in addition to the minimum of three months between induced ovulations). This necessitates maintaining several batches of frogs.

X. [REDACTED] Embryos need to be obtained twice a week, on average 40 weeks a year. Five female *Xenopus* are used each time given variations in egg quality and egg production. This amounts to 5 females x 2 times a week x 40 weeks = 400 times a year a female is hormonally stimulated for egg production. Females are rested for a minimum of three months before being injected for egg production again, so theoretically the minimum colony of females is 100. In practice the females are used between once or twice a year because of the periodic cessation of egg production (explained above). In practice a continuous population of 400 females (four times the minimal number, maintained in multiple tanks) is necessary to maintain a robust regime of embryo collection twice a week. There is a spontaneous death rate of up to 10% per year. This is due to age (females are used for egg production until they die) and some also die due to infections (mainly 'red leg', which is an immune insufficiency for commensal

aqueous bacteria). This requires an additional 40 females a year, so over the duration of the project an additional 200 females. This brings the total number of *X. [REDACTED]* females required to 600.

X. [REDACTED] Embryos need to be obtained from *X. [REDACTED]* a limited number of times, estimated once per month. Five female *Xenopus* are used each time given variations in egg quality and egg production. This amounts to 5 females x 12 times a year = 60 times a year a female is hormonally stimulated for egg production. Females are rested for a minimum of three months before being injected for egg production again, so theoretically the minimum colony of females is 15. In practice the females are used between once or twice a year because of the periodic cessation of egg production (explained above). In practice a continuous population of 60 females (four times the minimal number, maintained in multiple tanks) is necessary to maintain a robust regime of embryo collection. There is a spontaneous death rate of up to 10% per year (explained above). This requires an additional 6 females a year, so over the duration of the project an additional 30 females. This brings the total number of *X. [REDACTED]* females required to 90.

B. The animals

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

Embryos of the amphibian *Xenopus* species represent an excellent non-mammalian model system for development and differentiation. Among the advantages is the external development of the embryos, which makes them experimentally accessible without the need for invasive perturbation, which is a significant advantage both from a practical and refinement perspective. Relatively large numbers of these embryos can be obtained, which readily enables biochemical approaches to gene regulation. In addition there are well-developed experimental approaches in this model, including gene perturbation and embryological manipulations such as microdissection of pluripotent cells of the animal cap. Studies of early embryonic gene function in *Xenopus* have contributed enormously to elucidating the molecular properties and functional roles of genes, including genes involved in human cancer and disease. *Xenopus [REDACTED]* is used because of its true diploid genome and similar gene content compared to human. Allo-tetraploid *Xenopus [REDACTED]* is an emerging model for genome evolution because of a relatively recent whole genome duplication. Because of these advantages, it is a unique non-mammalian vertebrate model system for exploring molecular mechanisms of gene regulation and for studying the earliest stages of vertebrate embryonic development.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
<i>Xenopus [REDACTED]</i> (outbred wild type Nigerian strain)	Bred in-house	600	mature adult (9 months and older)
<i>Xenopus [REDACTED]</i> (outbred wild type)	Bred in-house	90	mature adult (12 months and older)

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.

Adult female *Xenopus* can be used periodically (up to four times a year) for egg production for the duration of their life time. The subcutaneous injection and squeezing procedures cause minimal (mild) discomfort from which the animals quickly recover. They are rested a minimum of 3 months before being used again. There is no noticeable accumulation of distress (egg production itself is a top level measure of welfare). Re-use reduces the number of experimental animals that need to be bred.

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: Why studying embryonic development in an animal model? (1) It is of paramount importance to study gene regulation in vertebrate embryos. Vertebrate model systems are needed because embryonic development of vertebrates – although highly analogous during many phases to the development of other metazoans – involves vertebrate-specific mechanisms and adaptations. To understand human development and disease it is essential to study a variety of model systems, including non-mammalian vertebrate model systems such as *Xenopus*. (2) It is also extremely important to study developmental mechanisms in whole embryos rather than using cell-based culture systems, because cell-based systems do not exhibit the same degree of regulatory and biological complexity; this involves a specific 'niche' for all of the cell types involved and complex interactions among them. Moreover, embryonic development features processes such as pattern formation and morphogenesis. Also, the Darwinian growth selection of cells in culture is limiting their usefulness in studying physiological processes. Chromatin-based mechanisms of gene regulation (DNA methylation, Polycomb repression) for example are quite abnormal in cultured cells. Simply put:

Embryonic development needs to be studied in embryos.

Reduction: The number of animals cannot be reduced further. *Xenopus* females lay relatively large numbers of eggs, which constitutes a reduction in the number of animals needed compared to mammalian systems where the number of embryos is more than an order of magnitude smaller.

Refinement: The extent of discomfort of female *Xenopus* which are used for egg production is minimal (mild) and originates from receiving a subcutaneous injection and from being handled. *Xenopus* females lay eggs which develop externally. Any manipulation, observation and sample collection of embryos occurs outside the mother. This constitutes a significant refinement compared to the intra-uterine development in mammalian model systems such as mouse.

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

Adverse effects are minimal but mainly due to (mild) stress. The working conditions in the room are kept calm and quiet to reduce stress from handling (injection and squeezing). There are no adverse effects on the environment.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mild stress.

Explain why these effects may emerge.

Handling: Subcutaneous injection, squeezing.

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

Keeping the room quiet, to prevent building up of stress.

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.

Signs of discomfort, such as lethargy, systemic oedema (swelling), skin infections (ulcers) or septicemia ('red leg). If these signs of discomfort are observed, the animal will be taken out of the experiment and euthanized by anesthetic overdose with MS-222 (30 min. in sodiumcarbonate-buffered pH neutral solution of 5-10 g/l).

Indicate the likely incidence.

Less than 10% of the group per year.

K. Classification of severity of procedures

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

Mild (subcutaneous injection and handling).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

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

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 male will be killed under anesthesia. The testis will be removed and used for *in vitro* fertilization to study embryonic development.

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

The animal is anesthetized by immersion in MS 222 (0.5 g/l Tricaine methanesulfonate, bicarbonate-buffered). This results in deep anesthesia within 5 minutes. The male is then decapitated followed by pithing.

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

As the scientific experiments focus on embryos (Gene-regulatory control of embryonic development), and a single pair of testes will suffice for *in vitro* fertilizations on the same day, the statistics of animal use (adult males) are based on the number of days *in vitro* fertilization needs to be performed. The procedure for euthanizing males of X. [REDACTED] and X. [REDACTED] are identical and are covered by two animal groups in the same protocol. X. [REDACTED] embryos need to be obtained twice a week, on average 40 weeks a year. In principle this amounts to 80 X. [REDACTED] males per year if planned optimally and if all males have testes and produce functional sperm. This however is by far not the case. In reality, every other time another male needs to be sacrificed, bringing the total to 120 males per year, i.e. 600 male X. [REDACTED] for the duration of the project. X. [REDACTED] embryos need to be obtained a limited number of times, estimated once per month. In principle this amounts to 12 X. [REDACTED] males per year. In practice a few more are required as some males do not have testes or do not produce functional sperm, bringing the total to 20 males per year, i.e. 100 male X. [REDACTED] for the duration of the project.

B. The animals

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

Embryos of the amphibian *Xenopus* species represent an excellent non-mammalian model system for development and differentiation. Among the advantages is the external development of the embryos, which makes them experimentally accessible without the need for invasive perturbation, which is a significant advantage both from a practical and refinement perspective. Relatively large numbers of these embryos can be obtained, which readily enables biochemical approaches to gene regulation. In addition there are well-developed experimental approaches in this model, including gene perturbation and embryological manipulations such as microdissection of pluripotent cells of the animal cap. Studies of early embryonic gene

function in *Xenopus* have contributed enormously to elucidating the molecular properties and functional roles of genes, including genes involved in human cancer and disease. *Xenopus* [REDACTED] is used because of its true diploid genome and similar gene content compared to human. Allo-tetraploid *Xenopus* [REDACTED] is an emerging model for genome evolution because of a relatively recent whole genome duplication. Because of these advantages, it is a unique non-mammalian vertebrate model system for exploring molecular mechanisms of gene regulation and for studying the earliest stages of vertebrate embryonic development.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Xenopus [REDACTED]	Bred in-house	600	mature adult (9 months and older)
Xenopus [REDACTED]	Bred in-house	100	mature adult (12 months and older)

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 - Why studying embryonic development in an animal model?

(1) It is of paramount importance to study gene regulation in vertebrate embryos. Vertebrate model systems are needed because embryonic development of vertebrates – although highly analogous during many phases to the development of other metazoans – involves vertebrate-specific mechanisms and adaptations. To understand human development and disease it is essential to study a variety of model systems, including non-mammalian vertebrate model systems such as *Xenopus*.

(2) It is also extremely important to study developmental mechanisms in whole embryos rather than using cell-based culture systems, because cell-based systems do not exhibit the same degree of regulatory and biological complexity; this involves a specific 'niche' for all of the cell types involved

and complex interactions among them. Moreover, embryonic development features processes such as pattern formation and morphogenesis. Also, the Darwinian growth selection of cells in culture is limiting their usefulness in studying physiological processes. Chromatin-based mechanisms of gene regulation (DNA methylation, Polycomb repression) for example are quite abnormal in cultured cells. Simply put: Embryonic development needs to be studied in embryos.

Reduction - How do the choices made in the approach and animal experiments result in the lowest possible number of animals used for experiments? The number of animals cannot be reduced further.

(1) The method for killing and obtaining the testis is very quick, which avoids unnecessary killing of males which would happen if the male is killed before eggs from females can be obtained. Females do not always produce high quality eggs. However, once obtained the eggs must be fertilized within minutes. A quick procedure for killing the male and obtaining the testes allows postponing the decision to kill the animal until it is clear the testis will be used.

(2) The choice of the *Xenopus* system is also advantageous for the number of animals that are required: females lay relatively large numbers of eggs, which constitutes a reduction in the number of animals needed compared to mammalian systems where the number of embryos is more than an order of magnitude smaller. Therefore choosing the *Xenopus* system over mammalian systems leads to the use of fewer animals.

Refinement - How do the choices made in the approach and animal experiments result in minimal discomfort?

(1) The procedure to kill the *Xenopus* male is swift with minimal discomfort. An alternative for killing the male for the testes and doing *in vitro* fertilization would be natural matings of males and females. However, this is not suitable as the developmental stage of resulting embryos would be too heterogeneous for experimental purposes. Also microinjections in fertilized eggs (just after fertilization) would be impossible.

(2) The use of the *Xenopus* system, the embryos of which develop externally, means that any manipulation, observation and sample collection of embryos occurs outside the mother. This constitutes a significant refinement compared to the intra-uterine development in mammalian model systems such as mouse.

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

No adverse effects.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The animal is anesthetized by immersion in MS 222 (0.5 g/l Tricaine methanesulfonate, bicarbonate-buffered). This results in deep anesthesia within 5 minutes.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

none

Explain why these effects may emerge.

Not applicable

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

Not applicable

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

Non-recovery

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

The animal procedure is killing the animal. This is necessary to obtain the testes.

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.

The animals are killed under anesthesia with MS 222 (tricaine methanesulfonate) by decapitation and destruction of the brain and the brainstem by pithing.

This is justified based on the following considerations: The EU directive on the protection of animals stipulates the following methods for killing amphibians (Annex IV): (1) Anesthetic overdose, (2) concussion / percussive blow to the head, and (3) electrical stunning. There are problems with all three allowed methods. Frogs have been shown to recover from prolonged anesthetic overdose, therefore this method is humane but not robust (i.e. not guaranteed to kill the animal). Methods 2 and 3 are also not guaranteed to kill the animal and are also arguably inhumane (i.e. not without pain). Decapitation followed by pithing (which destroys the brain) is the most robust and also a very swift way to kill frogs. When performed under deep anesthesia this method is humane too. This method is not listed but allowed under the EU directive as it also states that "Methods other than those listed may be used on (a) unconscious animals, providing the animal does not regain consciousness before death". The method also fulfills the requirement that the killing is completed by "(b) the destruction of the brain".

Yes

3 Prevention measures: Keeping the room quiet, to prevent building up of stress.

*DAP2

-A3: Volgens de aanvrager zijn er in de praktijk iets meer dieren (a few more) nodig omdat sommige mannen geen testes hebben of geen functioneel sperma produceren. Er worden hiervoor 50% meer dieren aangevraagd. Dit lijkt een wel erg ruime interpretatie van 'a few more'.

Antwoord: De formulering is aangepast: "In principle this amounts to 80 X. [redacted] males per year if planned optimally and if all males have testes and produce functional sperm. This however is by far not the case. In reality, every other time another male needs to be sacrificed, bringing the total to 120 males per year."

-K: Klopt de classificatie? Doden zonder voorafgaande handelingen is licht ongerief.

Antwoord: De dieren worden eerst diep geanestheseerd, vervolgens gedood met een methode die niet volledig past binnen de kaders van de EU richtlijn. Echter de EU richtlijn staat doden via andere methoden toe mits de dieren geanestheseerd zijn. Als ik het goed begrepen heb komt dat overeen met "non-recovery".

De EU richtlijnen voor amfibieën zijn niet goed, zie antwoord op opmerking over onderbouwing bij L2 (hieronder).

-L2: De onderbouwing voor het gebruik van deze methode ontbreekt. In de beschrijving van de handelingen bij A is geen sprake van anesthesie en wordt decapitatie genoemd als dodingsmethode. Dit lijkt in tegenspraak met deze informatie.

Antwoord: Dit staat vermeld onder H3: "The animal is anesthetized by immersion in MS 222 (0.5 g/l Tricaine methanesulfonate, bicarbonate-buffered). This results in deep anesthesia within 5 minutes." maar stond per abuis niet vermeld onder A2. Dit is aangepast.

Onderbouwing van deze methode van euthanasie is toegevoegd:

The EU directive stipulates the following methods for killing amphibians (Annex IV): (1) Anesthetic overdose, (2) concussion / percussive blow to the head, and (3) electrical stunning. There are problems with all three allowed methods. Frogs have been shown to recover from prolonged anesthetic overdose, therefore this method is humane but not robust (i.e. not guaranteed to kill the animal). Methods 2 and 3 are also not guaranteed to kill the animal and are also arguably inhumane (i.e. not without pain). Decapitation followed by pithing (which destroys the brain) is the most robust and also a very swift way to kill frogs. When performed under deep anesthesia this method is humane too. This is allowed used under the EU directive as it also states that "Methods other than those listed may be used on (a) unconscious animals, providing the animal does not regain consciousness before death". The method also fulfills the requirement that the killing is completed by "(b) the destruction of the brain".

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

-3.5: De juiste aanduiding voor de ernst van de dierproeven is licht i.p.v. mild.

Antwoord: Licht i.p.v. mild: Dit is aangepast. Verder waren aanpassingen aan de NTS niet noodzakelijk.

- 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. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project'. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er 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. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het verkrijgen van *Xenopus* embryos om hierin de genregulatie tijdens de vroege ontwikkeling (laat blastula en vroeg gastrula stadium) te onderzoeken. Het uiteindelijke doel van deze projectaanvraag is fundamentele kennis te vergaren over de normale embryonale ontwikkeling en differentiatie en de regulatoire processen daarvan. Deze kennis kan op termijn bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor aangeboren afwijkingen, genetische afwijkingen en kanker. Het ontwikkelen van klinische toepassingen op basis van de vergaarde kennis is geen onderdeel van deze projectaanvraag en de commissie verwacht niet dat de aanvrager dit zal gaan uitvoeren. Er is binnen dit project daarom geen directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het lange termijn doel, te weten de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor aangeboren afwijkingen, genetische afwijkingen en kanker. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project daaraan zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van genregulatie tijdens embryonale ontwikkeling op dit moment nog beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor een beter begrip van embryonale ontwikkeling en differentiatie en dat deze kennis cruciaal is voor belangrijke medische kwesties waaronder aangeboren afwijkingen/ziekte, stamceltherapie en kanker. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress

ondervinden en pijn ondergaan. Een deel van de dieren zal in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor de samenleving/patiënten is dit onderzoek indirect van belang, omdat de vergaarde kennis op termijn kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelmethoden voor aangeboren ziekten en kanker. Kunnen beschikken over fundamentele kennis over genregulatie tijdens de embryonale ontwikkeling is van groot belang voor de voortgang van onderzoek op dit terrein. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Uiteindelijk is dat ook voor de samenleving van belang.

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet sluit hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)

De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: 'The EU directive on the protection of animals stipulates the following methods for killing amphibian (Annex IV): (1) Anesthetic overdose, (2) concussion / percussive blow to the head, and (3) electrical stunning.

There are problems with all three allowed methods. Frogs have been shown to recover from prolonged anesthetic overdose, therefore this method is humane but not robust (i.e. not guaranteed to kill the animal) Methods 2 and 3 are also not guaranteed to kill the animal and are also arguably inhumane (i.e. not without pain). Decapitation followed by pithing (which destroys the brain) is the most robust and also a very swift way to kill frogs. When performed under deep anesthesia this method is humane too. This is allowed used under the EU directive as it also states that “Methods other than those listed may be used on (a) unconscious animals, providing the animal does not regain consciousness before death”. The method also fulfills the requirement that the killing is completed by “(b) the destruction of the brain”. De DEC is het eens met deze onderbouwing. De dieren mogen immers volgens de richtlijn gedood worden met een overdosis anesthesie. Het vernietigen van het brein van het dier onder diepe anesthesie kan worden opgevat als een extra maatregel die zeker kan stellen dat het dier niet toch nog bijkomt uit die anesthesie. De DEC ziet daar volstrekt geen bezwaar tegen.

10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Er is wellicht discussie mogelijk over de vraag of de gebruikte dodingsmethode moet worden geclassificeerd als non-recovery of licht ongerief. De aanvrager is zelf in de aanvraag en de NTS niet helemaal consequent in de inschatting van het ongerief. De DEC is van mening dat het ongerief als licht dient te worden geclassificeerd, maar acht de kwestie “licht of *non recovery*” voor de ethische afweging in dit geval niet van belang.
12. De integriteit van dieren wordt in lichte mate aangetast door de hormonale injecties en het instrumentele gebruik dat inherent is aan dierproeven, maar voor het overige is van aantasting van de integriteit geen sprake.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met deze dieren en deze behandeling ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De genregulatie in embryo's kan niet goed zonder embryo's onderzocht worden, omdat essentiële processen in embryonale ontwikkeling niet nagebootst kunnen worden met cellijnen.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. *Xenopus*-vrouwtjes leggen veel eieren, waardoor er relatief weinig dieren nodig zijn voor de productie van eitjes die na bevruchting met zaad van *Xenopus*-mannetjes embryo's opleveren die makkelijk bestudeerd en gemodificeerd kunnen worden. De vrouwtjes kunnen na een rustperiode van drie maanden opnieuw gebruikt worden. Voor de bevruchting van meerdere eitjes van meerdere vrouwtjes wordt één mannetje gedood om zaad te verkrijgen.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Embryo's van *Xenopus* ontwikkelen zich buiten het lichaam van de moeder. Hierdoor zijn ze makkelijk te observeren, te manipuleren en te bemonsteren. De embryo's zelf worden niet beschouwd als proefdieren. Er wordt geen gebruik gemaakt van natuurlijke bevruchting, omdat dit resulteert in teveel variatie in het ontwikkelingsstadium van embryo's. De procedure voor het oogsten van eicellen is weinig belastend voor de vrouwelijke dieren, en zij krijgen voldoende rust tussen de procedures. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal om begrijpelijke redenen in het project in bijlage 1 (productie van eicellen) alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren en bijlage 2 (verkrijgen van zaad) alleen van mannelijke dieren.
19. De vrouwelijke dieren worden niet gedood in het kader van het project. De mannelijke dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om zaad te kunnen oogsten waarmee eicellen bevrucht worden embryo's te verkrijgen. De gebruikte dodingsmethode staat niet vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Voor het behalen van de doelstelling is het gebruik van deze dodingsmethode niet noodzakelijk, maar de DEC is het met de aanvrager eens dat de door hem voorgestelde dodingsmethode de meest humane is en feitelijk geen bezwaarlijke afwijking van de EU-richtlijn vormt (zie onderdeel C9 van dit advies).
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken. Voor de samenleving is dit onderzoek van belang, omdat het fundamenteel wetenschappelijke kennis over genregulatie tijdens de vroege embryonale ontwikkeling kan opleveren. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Kennis van de normale embryonale ontwikkeling en differentiatie en de regulatie van genen die daarbij betrokken zijn, is uiteindelijk van cruciaal belang voor de aanpak van medische problemen op gebied van aangeboren ziekten, regeneratieve geneeskunde en kanker. Het onderzoek richt zich op het beantwoorden van de vraag hoe genregulatie tijdens de ontwikkeling plaatsvindt en hoe de ontwikkelingsinstructies die vastgelegd zijn in genomische informatie op een zeer gereguleerde manier progressief

beschikbaar komen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het vergaren van meer kennis over genregulatie tijdens embryonale ontwikkeling van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het verkrijgen van *Xenopus* embryos om hierin de genregulatie tijdens de vroege ontwikkeling (laat blastula en vroeg gastrula stadium) te onderzoeken. Het uiteindelijke doel is fundamentele kennis te vergaren over de normale embryonale ontwikkeling en differentiatie en de regulatoire processen daarvan. Deze kennis kan op termijn bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor aangeboren afwijkingen, genetische afwijkingen en kanker. De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving en de wetenschap voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

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

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171826

Bijlagen

2

Datum 23 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 mei 2017. Het gaat om uw project "Gene-regulatory control of embryonic development". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020171826. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

23 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171826

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171826

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postbus: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED]
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171826

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]
Postbus: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED]

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 2018
Geplande einddatum: 31 december 2022
Titel project: Gene-regulatory control of embryonic development
Titel niet-technische samenvatting: Hoe genen de embryonale ontwikkeling aansturen
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:
23 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171826

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 23 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Instantie voor dierenwelzijn

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171826

Bijlagen

2

Datum 23 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 mei 2017

Vervaldatum: 22 juni 2017

Factuurnummer: 171826

Ordernummer: 040823-461220/ 2017-0009 / [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020171826	€ 1.287,00

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

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, t.a.v. CDL, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020171826
Bijlagen
1

Datum 6 juni 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]

Op 23 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Gene-regulatory control of embryonic development" met aanvraagnummer AVD1030020171826. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Gene-regulatory control of embryonic development" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 mei 2017. 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 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:
6 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171826

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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

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

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Gene-regulatory control of embryonic development" met aanvraagnummer AVD1030020171826, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar . Voor de uitvoering van het project is IWKV verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 mei 2017, ontvangen op 23 mei 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Xenopus females for egg production				
	Klauwkikkers (Xenopus [REDACTED] en Xenopus [REDACTED] is) / 600 Xenopus [REDACTED] 90 Xenopus [REDACTED]	690	Licht	
3.4.4.2 Xenopus males				
	Klauwkikkers (Xenopus [REDACTED] en Xenopus [REDACTED] / 600 Xenopus [REDACTED] 100 Xenopus [REDACTED]	700	Terminal	

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

Aanvraagnummer:
AVD1030020171826

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:
AVD1030020171826

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:
AVD1030020171826

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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