



26 NOV. 2015

AVD 115002015310

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500
 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	[Redacted]
KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7

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

Straat en huisnummer	Instatie voor Dierenwelzijn
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	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

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

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 . 1 2 . 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 . 1 2 . 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Influence of non-conventional CV risks due to CKD on aortic vascular graft in situ TE
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De invloed van nierfalen op weefselconstructie van bloedvaten
- 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 € 741,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats 

Datum *23* 

Handtekening 





Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Background For this project we are interested in the influence of chronic kidney disease on the outcome of vascular tissue engineering. Chronic kidney disease (CKD) is associated with several non-conventional immunological and vascular risk factors as well as stem cell dysfunction. CKD leads to increased risk of vascular calcification, resulting in cardiovascular mortality and morbidity. CKD and end-stage kidney disease (ESKD) are strongly associated with systemic inflammation and acquired immune dysfunction (Machowska et al., 2015; Trans. Res.). Immune dysfunction affects the innate and adaptive immune systems, resulting in inflammation, a key driver of cardiovascular disease (CVD) (Machowska et al., 2015; Trans. Res.). At the same time, there is growing evidence that (circulating) stem cells may have altered or sub-optimal function in CKD in humans and experimental rodents (van Koppen et al., 2012; Cell Transplant.). Using *in situ* tissue engineering (TE), synthetic materials can be directly implanted in the body without the need to add cells, with the aim to replace dysfunctional tissue such as a blood vessel. *In situ* TE may provide a vascular access point for ESKD patients on dialysis. Other applications of *in situ* TE may also concern patients with CKD, for instance patients needing heart valve replacements. However, the principles of *in situ* TE are based upon the immune system having sufficient capacity to mobilize circulating cells to sites of injury to initiate regeneration and/or healing. It is therefore important to investigate whether or not the healing process after *in situ* TE is compromised in CKD due to the presence of immunological and vascular risk factors as well as stem cell dysfunction.

Rationale for disease in TE Up to this point, *in situ* TE research has solely focused on tissue healing and regeneration in healthy *in vitro* and *in vivo* settings and only one clinical trial been conducted. In the clinic, *in situ* TE will be applied in pathological circumstances. Since we know that the immune system, next to the vascular system and stem cell function, plays a role in the healing process after *in situ* TE (Hibino et al., 2011; FASEB J) normal immune function may be critical to produce functional tissue. To enhance this healing process, several factors that attract stem cells and/or initiate healing have been proposed. The idea is to couple these factors to the synthetic material *in vivo*, hereby boosting functional tissue formation (bio-functionalization). The cyto- and chemokines, which we use for this boost, have been selected based on their roles within a correct immune and vascular system. Therefore it is important to investigate whether or not a systemic pathological environment may alter outcome of *in situ* TE with and without bio-functionalization.

Rationale for CKD in TE The clinical application of *in situ* TE is primarily expected in patients with a comorbidity of vascular problems. Next to CKD, high-prevalence diseases like atherosclerosis and metabolic syndrome are therefore of interest. Our department will investigate the influence of atherosclerosis on vascular TE in an ApoE mouse (previous DEC application of this group) while a partner university will investigate the metabolic syndrome in parallel. The risk factors in atherosclerotic disease and plaque formation are however essentially

different from those in CKD. CKD patients primarily suffer from arteriosclerosis, in which not fatty plaque formation but thickening and calcification of the medial arterial wall layer is the main problem. Circulating toxic compounds normally cleared by the kidney may affect the function of the immune and vascular system and subsequent function of stem cells. Other diseases affecting the vasculature, like Alzheimer, are primarily confined to the cerebral vasculature and dependent on age. Since the CKD risk factor profile is highly prevalent and is non-overlapping with that of atherosclerosis, both projects can be performed independently and in parallel.

Experimental rationale During this project we will investigate whether or not CKD influences the early outcome (e.g. cellularization and presence of immune cells) after *in situ* TE, both in animals with 'empty' vascular grafts (bare scaffolds) and scaffolds to which these boost factors have been added (bio-functionalization). We will start this project by investigating the rat with CKD induced by 5/6th nephrectomy. The use of the CKD rat will allow us to study the effect of CKD on outcome after *in situ* TE, with and without bio-functionalization. We will then proceed with investigating an immune-compromised mouse in which we can introduce human stem cells (humanized mouse). The humanized mouse will allow us to study the presence and origin of different immune cells after *in situ* TE, with and without bio-functionalization. Finally, we will also introduce volume-overload induced hypertension and renal disease using a high salt-diet and hormone administration (deoxycorticosterone acetate, DOCA). The DOCA-salt humanized mouse will only be tested if a single bio-functionalization candidate is promising enough, based both on the outcome of the studies in the CKD rat and in the non-CKD humanized mouse. This will allow us to validate the workflow and double check the importance of a promising bio-functionalization candidate in a second kidney disease model in a humanized immune environment.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

We at the Dept. of Nephrology and Hypertension are currently performing research in a broad field of scientific subjects (<http://www.reconnect-umc.eu>, (Gremmels et al., 2015; Eur. J. Pharmacol, Papazova et al., 2015; Dis. Model. Mech, Wester et al., 2014; Artif. Organs), all within the context of renal failure. A new spearhead within the department is stem cells and renal failure in tissue engineering (TE).

The main hypothesis of this project is that alterations to the vascular and immune system due to CKD influence initial and thus long-term tissue formation after *in situ* TE.

Our **first aim** is to investigate the influence of the disease CKD on early tissue outcome after scaffold implantation. To achieve this goal, multiple departments and universities will work together. We will make use of validated protocols and expertise, thus improving feasibility of the project and decreasing mortality of animals. Moreover, *in vitro* work will be performed in parallel and will support and complement *in vivo* experiments. A well-established model of CKD, the 5/6th nephrectomy, will be used in the rat. We have a long-standing track-record in performing this surgical procedure in rodents (van Koppen et al., 2012; Cell Transplant., van Koppen et al., 2013; JOVE). The placement of the small-diameter scaffold (e.g. an aortic interposition graft) has been mastered under the current training DEC 2011.II.03.056. From this first part, we will gain knowledge on how on a mechanistic and molecular level, CKD influences the outcome after *in situ* TE, validated both *in vitro* and *in vivo*. This will strengthen the translation of *in situ* TE to the clinic for patients with CKD.

Our **second aim** is to approximate the human situation with respect to TE and renal disease. To achieve this goal, a mouse without a functional immune system will be used in which human stem cells can be transplanted (CD34+ cell transplantation, together called humanized mouse). Currently, we are working on collaborations to determine the optimal mouse for this project, which is also susceptible for the development of renal disease. Using a humanized mouse we will be able to dissect the origin of the cells found in the early phase after scaffold implantation, e.g. human-derived circulating immune cells versus mouse-derived resident and migratory cells.

From this part, we will gain knowledge on how on a mechanistic and molecular level *in situ* TE works and how the origin of cells (e.g. resident versus circulating) infiltrating the scaffold contribute to initiation and early tissue formation. Moreover, this mouse will allow us to validate the workflow and double check the importance of a promising bio-functionalization candidate in a second kidney disease model in a humanized immune environment.

Our **third aim** is to investigate the influences of bio-functionalization (e.g. boost factors attracting stem cells or accelerating healing) of scaffolds *in vivo*, (Muylaert et al., 2014; Heart, Muylaert *et al.*, unpublished results). Based on their roles in attracting immune cells and their healing capacity, [REDACTED] have been selected to be added to the scaffold: [REDACTED]

[REDACTED] (Muylaert et al., 2014; Heart, Hibino et al., 2011; FASEB J, Franz et al., 2011; Biomaterials). To achieve our goal, bio-functionalized scaffolds [REDACTED] will be implanted both in the CKD rat and the humanized mouse, to examine the effect on cellular infiltration in both renal disease and healthy situations.

From this first part, we will gain knowledge on how on a mechanistic and molecular level, bio-functionalization influences the outcome after *in situ* TE, validated both *in vitro* and *in vivo* and in healthy versus CKD situations. This will strengthen the translation of bio-functionalized *in situ* TE scaffolds to the clinic for specific patient populations.

3.3 Belang

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

In situ TE will bring new alternatives to the clinic for multiple patient populations in need of vascular replacements. Replacement of blood vessels, for instance in ESKD patients on dialysis needing vascular access, would be a relevant new therapy. Previous *in vitro* and *in vivo* studies have focused on cellularization of scaffolds, but all in the context of functionally healthy immune and vascular systems. There is accumulating evidence that specifically CKD results in a compromised immune system, alterations to the vascular system and dysfunction of (circulating) stem cells, among others due to the high circulating levels of toxins normally cleared by the kidney. Therefore attracting stem cells from the circulation and bone marrow for *in situ* TE may not be function similarly in CKD compared to healthy situations. The healing process may also differ due to functional problems with the immune system. This may result in a different functional outcome for the tissue. Bio-functionalization of a scaffold, based on attracting cells and inducing healing in healthy circumstances, may also have an altered outcome due to a CKD milieu. By investigating the effect of CKD in different animals, we believe we can investigate the influence of this underlying pathology and its effect on the immune and vascular system and stem cell function when applying *in situ* TE.

Concluding, we believe that there is an association between the outcome of *in situ* TE and the presence of CKD. Since a high percentage of the patients eligible for *in situ* TE will suffer from non-conventional risk factors due to CKD, this project is highly relevant to elucidate mechanisms of *in situ* TE in rodents with CKD. Ultimately this will accelerate the introduction of *in situ* TE in the clinic.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Our primary approach for the rat will consist of looking at mechanistic and cellular differences between CKD and healthy animals, not taking aging into account. In parallel, *in vivo* data will be complemented with *in vitro* data (Smits et al., 2014; Cell. Mol. Med.). In *in vitro* experiments we will dynamically flow whole blood over a scaffold, mimicking blood flow. Moreover, due to our strong link with the clinic, we plan to use blood samples from CKD patients to support our hypothesis. As a readout, we will look at gene expression markers of inflammation and polarization of macrophages infiltrated in the scaffold. It is believed that sustained inflammation (represented by M1 macrophages) can negatively influence tissue outcome, see **Figure 1**. We will *in vitro* and *in vivo* be able to test whether there is more severe or sustained inflammation in CKD versus healthy circumstances.

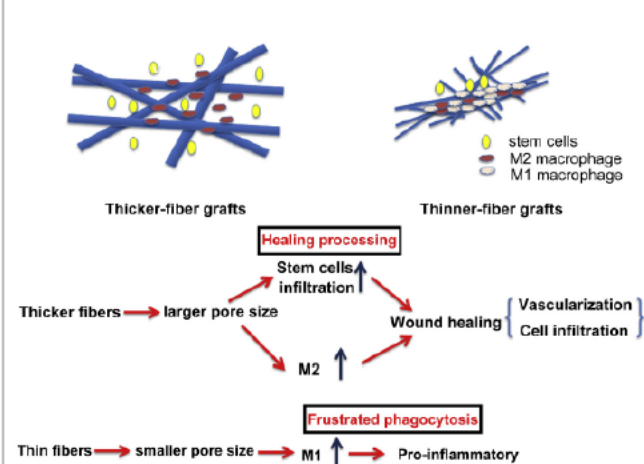
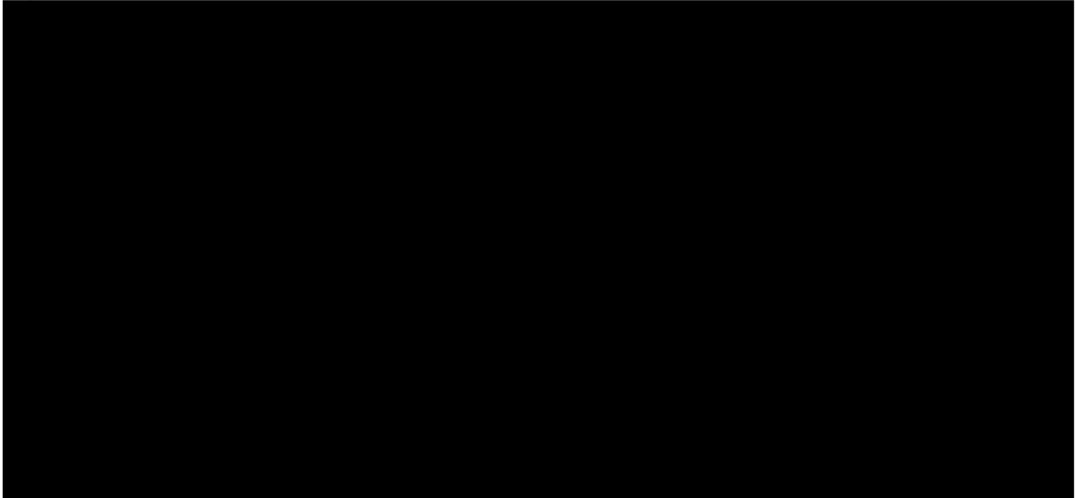


Figure 1: The dimensions of the fibers present in the synthetic scaffold have been shown to influence the presence of M1 versus M2 macrophages. The sustained and high presence of M1 macrophages negatively influenced the healing process and thus tissue formation. (Wang et al., 2014; Biomaterials). Since CKD results in systemic inflammation and dysfunctional vascular tissue, CKD may also lead to sustained M1 levels and thus to poor tissue outcome compared to healthy circumstances.

The presence of cells in the scaffold of the *in vitro* experiments will also help predict the outcomes of the bio-functionalization protocols for the *in vivo* experiments. Strong evidence for counteractive effects for the chosen [redacted] are considered a 'no go' moment for the *in vivo* work. However, *in vitro* data alone will not give us sufficient insight into the process of tissue formation and healing. The complexity of in the *in vivo* system, with factors signalling from and to the bone marrow, is only present *in vivo*. Tissue formation in bare and bio-functionalized scaffold implanted in the abdominal aorta will therefore be studied in the CKD rat versus healthy controls, to investigate how CKD influences tissue formation *in vivo* and whether or not the chosen boost factors show accelerated healing and tissue formation in CKD.

The overall chronological events occurring *in vivo* after *in situ* TE in healthy circumstances have been well documented, see **Figure 2**.



Depending on the type of synthetic material used, the scaffold material will be broken down over time by infiltrated cells, leaving a functional tissue behind. The [redacted] material that we are planning to use, is believed to have degradation time of months, ensuring that functional tissue is formed before the complete breakdown of the scaffold. While chronic *in vivo* studies on this material have not been performed, these synthetic materials are not believed to evoke an adaptive (memory) immune response. The material is completely bio-degradable and will be cleared with the help of innate immune components. The long-term outcome of tissue functionality after *in situ* TE is primarily dependent upon the fast inflammatory response that takes places within the first two weeks after implantation. [redacted]



[REDACTED]

[REDACTED]

In the CKD versus healthy rat we will perform multiple *in vivo* terminal measurements before explanting the scaffold.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] sing immunohistochemistry, qPCR and Western Blot. We will repeat this using bio-functionalization of the scaffold in both healthy and CKD animals, to investigate whether or not bio-functionalization can alter the outcome after *in situ* TE.

Once a most effective bio-functionalization target has been selected based on CKD rat results, we will proceed to the humanized mouse. Our primary approach for the mouse will consist of investigating the role and origin of immune cells and their contribution to tissue formation and healing after *in situ* TE. In the immunocompromised mouse, we will first perform sub lethal irradiation to prevent the risk of transplant rejection of the human stem cells. While we intent to reach the highest percentage of chimerism (percentage of human cells engrafted in the mouse) as possible, the immune system should still be functional enough not to affect healing. While there are multiple immunocompromised models available for our type of research, we still have to find an optimum between chimerism and improved outcome after *in situ* TE. We are therefore currently deciding the most suitable mouse for our project.

[REDACTED] After explanting the scaffold in the humanized mouse within the same timeframe as chosen for the CKD rat [REDACTED] we will specifically investigate the

presence of human versus mouse-derived cells in the scaffold by immunohistochemistry. Double-staining for human markers with macrophage, myofibroblast and endothelium markers will help us elucidate whether or not circulating stem cells can transdifferentiate into functional tissue cells. The presence of mouse-specific markers can help us elucidate the relative contribution of cells migrating into the scaffold from other origins such as the peritoneal cavity. Adding bio-functionalization will help us elucidate the effect on relative abundance of circulation versus tissue-resident-derived cells. Moreover, by introducing renal disease in a humanized mouse, we will be able to dissect the influence of renal disease on the effect of circulating immune cells on the outcome of *in situ* TE.

Based on both *in vitro* results, the results on bio-functionalization in the CKD rat and results on the effect of a humanized mouse, one bio-functionalization candidate will be tested in a renal disease model of the humanized mouse. This will allow us to validate the workflow and double check the importance of a promising bio-functionalization candidate in a second kidney disease model in a humanized immune environment.

To gain as much information as possible from a single animal, we will thus perform different types of measurements. Other relevant tissues (e.g. heart, bone marrow, kidney and aorta remnant in CKD rat and heart, spleen, bone marrow and aorta remnant in the humanized mouse) will be collected to assess weight, morphology and cellular infiltrate. Longitudinal non-invasive monitoring consists of collecting blood and urine and determining blood pressure.

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

Step a (Appendix 1: Rat CKD versus healthy control):

Appendix 1: Characterize morphological and functional (hemodynamic) changes after *in situ* TE in CKD rat versus healthy controls. For this, we will use adult female rats. The adult stage is both relevant for the translation of the project and preferred from a practical point of view. First, female rats will undergo 5/6th nephrectomy in a single surgery to induce CKD. Animals have determined CKD after they have reached a threshold of increased blood values of urea, a measurement of renal failure. They will then undergo surgery to implant 'bare' scaffolds. If a disease model is not compatible with the implantation of an abdominal scaffold (e.g. survival of animals until the end of the experiment <50%), this is considered a 'no go' moment and **Step b/c** will not be initiated. Due to the combination of the CKD-model and the implantation of the graft, we expect a percentage of animals to reach a humane-endpoint before the end of the study. Definite decisions of 'go, no go' moments in both Appendices at all time points will be taken in close coordination with the IvD. Based on results in **Step a** Appendix 1, disease-specific new targets or combinations of two or all three chosen chemokines can be selected to proceed and re-assess leading to **Step b**.

Step a (Appendix 2: Mouse model decision-making phase):

Appendix 2: Decide the optimal mouse without a functional immune system (immunocompromised mouse), taking into account the sensitivity for renal disease (e.g. deoxycorticosterone acetate (DOCA) and high salt). Another important consideration that we have to make is that higher engraftment of human cells will lead to a less favorable outcome after *in situ* TE (see Appendix 2).

Step b (Appendix 1: CKD versus healthy control with bio-functionalization):

Determine the effects of bio-functionalization on morphological and functional (hemodynamic) changes after *in situ* TE in CKD rat versus healthy controls. For **Step b**, the same CKD rat as in **Step a** will be used. During this experiment, we will focus on differences between results obtained from 'bare' scaffolds in **Step a** compared with bio-functionalized scaffolds in **Step b**. The primary focus will be on

cellularization and presence of immune cells. As in **Step a**, if a disease model is not compatible with the implantation of an abdominal scaffold with a specific chemokine (e.g. survival <50%), this is considered a 'no go' moment.

Step c (Translation from Appendix 1 to Appendix 2):

Determine the optimal intervention (e.g. bio-functionalized scaffold) for the CKD rat versus healthy control. Based on these results, **Step a/b** will be repeated for an immunocompromised mouse with and without human stem cell transplantation. With the use of this humanized mouse, we can specifically study the influence of human circulating (immune) cells in tissue formation and healing after *in situ* TE. We can also study alterations induced by bio-functionalization. Once again, if this model is not compatible with the implantation of an abdominal scaffold (e.g. survival <50%), this is considered a 'no go' moment.

Step d (Appendix 2: decision-making phase choosing a bio-functionalized target for renal disease):

Cumulatively, *in vitro* data, **Step b** from Appendix 1 and **Step b** from Appendix 2 will provide us with the best bio-functionalized scaffold to be tested in a humanized mouse with renal disease.

Step e (Appendix 2: renal disease versus healthy control with most promising bio-functionalized target):

The in step d chosen bio-functionalized scaffold will then be tested in an humanized mouse, with or without renal disease, induced by deoxycorticosterone acetate (DOCA) and high salt diet, resulting in volume-overload induced hypertension leading to renal disease.

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

The ultimate goal is to elucidate whether or not non-conventional risk factors due to CKD influence tissue formation and healing after *in situ* TE. Evidence indicates that the immune system, vascular system and stem cells may be dysfunctional in CKD. While these three components are important for the outcome of *in situ* TE, it is important to understand if and how CKD influences this outcome.

Using both a rat CKD model and a humanized mouse in a particular workflow order, will allow us to first gain experience in rat CKD before moving on to the more technically challenging humanized mouse.

The CKD rat experiments will provide us with results on how CKD influences healing and tissue formation.

Together this will help us in understanding the influence of immunological and vascular changes in CKD on *in situ* TE. Adding bio-functionalization to the scaffold will provide us with results on the mechanisms by which healing and tissue formation take place in CKD versus healthy rats. In parallel, *in vitro* results can be generated to support and complement our *in vivo* work.

The humanized mouse will then provide us with results in which we can dissect the effects of systemic renal disease (mouse-derived) versus the role of circulating immune cells (human-derived) on healing and tissue formation after *in situ* TE. This will help us translating and validating the results from the CKD rat in the humanized mouse. With this workflow, we can improve translation to the clinic while simultaneously unraveling fundamental mechanisms of *in situ* TE in disease.

During this project, both experiments in Appendix 1 and Appendix 2 will be performed over the course of 5 years. The order of experiments (in steps) as described in the Appendices will be crucial and maintained during our project; an overview is given in the figure below.

Step a Appendix 1
CKD versus healthy

CKD vs healthy rats implanted with bare scaffold



Step b Appendix 1
CKD versus healthy including bio-functionalization

CKD vs healthy rats implanted with bio-functionalized scaffolds



Step c Appendix 1
Determining best target

Determine optimal bio-functionalization target for CKD



Step a Appendix 2
Model decision-making phase

Choose appropriate model

Step b Appendix 2
Stem cell transplantation versus no transplantation

Immunocompromised mouse with human stem cell transplantation vs without transplantation implanted with bare scaffold



Step c Appendix 2
Stem cell transplantation versus no transplantation including bio-functionalization

Immunocompromised mouse with human stem cell transplantation vs without transplantation implanted with bio-functionalized scaffold



Step d Appendix 2
Determining best target

Determine optimal bio-functionalisation target for humanized mouse based on **Step c Appendix 1 and 2**



Step e Appendix 2
Humanized mice with best bio-functionalized scaffold in CKD vs. healthy mice

Humanized mice with best bio-functionalized scaffold in CKD vs healthy humanized mice

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Influence of CKD on TE aortic vascular grafts in the rat
2	Infiltration and early tissue formation of tissue-engineered aortic vascular grafts in a humanized mouse model of renal disease
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



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 | De invloed van nierfalen op weefselconstructie van bloedvaten
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | weefselconstructie, bloedvaten, nierfalen

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- 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
- 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>Steeds meer mensen krijgen last van nierfalen. Dit komt doordat mensen steeds ouder worden en omdat de medische zorg zo goed is geworden dat mensen langer kunnen leven ondanks medische problemen. Nierfalen is een ernstige ziekte met een grote invloed op het dagelijks leven en de levensverwachting van de patiënt. Bloedvaten bij patiënten met nierfalen kunnen uiteindelijk verstopt raken zodat er geen bloed meer bij weefsels kan komen. Dit leidt tot zuurstofgebrek, waardoor schade aan de weefsels ontstaat. De beste oplossing voor deze mensen is om een aangetast bloedvat te laten vervangen door een prothese. Dit is bijvoorbeeld voor hartkleppen al mogelijk maar bij bloedvaten nog niet.</p> <p>Een veelbelovende therapie is het maken van synthetische bloedvaten met behulp van weefselconstructie. Daar is al veel onderzoek naar gedaan, maar dat onderzoek tot nu toe is gedaan bij gezonde dieren. In ons onderzoek willen we kijken of deze weefselconstructie bij zieke dieren ook een goede behandeling kan zijn. Dit is belangrijk om te bekijken of deze therapie uiteindelijk in zieke mensen kan worden toegepast.</p> |
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | <p>Het wetenschappelijke belang van onze project is om te onderzoeken welke verschillen er zijn in ontsteking en wondheling bij ziekte (nierfalen) en gezondheid. Er is een toename in bewijs dat het immuunsysteem anders werkt bij nierfalen maar ook dat deze mensen aangetaste bloedvaten hebben. Wij willen graag weten wat er dan precies anders is en of dit wellicht invloed heeft op de therapie.</p> <p>Het maatschappelijke belang daarvan is om te beoordelen of de nieuwe therapie 'weefselconstructie' geschikt is voor mensen met nierfalen. Wellicht moet de therapie aangepast worden aan de patiënt. Hiermee verwachten wij uiteindelijk de zorg voor de patiënt verbeteren. We kunnen dan zieke mensen helpen hun welbevinden te verbeteren door een verstopt bloedvat te vervangen.</p> |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | <p>Voor dit onderzoek zullen wij zowel ratten als muizen gebruiken, zowel wild-type als genetisch gemodificeerde dieren.</p> <p>Ratten wild-type: 1444
muizen zonder immuunsysteem: 1116</p> |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | <p>De ratten ondergaan een operatie waarbij we delen van de nieren verwijderen. Bij muizen zonder immuunsysteem zullen we gaan kijken hoe het proces verloopt waarbij ingespoten menselijke immuuncellen een bloedvat herstellen. Daarnaast zullen we ook muizen nierfalen ontwikkelen door ze een hormoon en veel zout te geven waardoor ze hoge bloeddruk en nierschade ontwikkelen.</p> <p>Om bij te kunnen houden hoe ziek de dieren zijn, zal af en toe bloed worden afgenomen, bloeddruk worden gemeten of urine</p> |

worden afgenomen. Alle dieren zullen daarnaast, onder volledige verdoving, een synthetisch bloedvat krijgen, waarbij een stukje van hun eigen bloedvat verwijderd wordt. Omdat het belangrijk is dat de dieren goed herstellen, zullen ze tijdens de proeven nauwlettend in de gaten worden gehouden en tevens wordt er na alle operaties pijnstilling aan de dieren gegeven.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Ratten: matig ongerief (totale lengte proef >6 weken)
muizen zonder immuunsysteem: matig ongerief

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Alle dieren zullen aan het eind van de proef gedood worden om het geconstrueerde weefsel te kunnen onderzoeken. Daarnaast zullen we ook naar andere organen kijken, om te bestuderen wat het effect op de algemene gezondheid is.

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.

Tijdens dit project maken we ook gebruik van alternatieven voor dierproeven. Zo brengen we immuuncellen uit gezonde mensen in kweek samen met een prothese om te bekijken hoe cellen de prothese bedekken en afbreken. Ook willen wij in de toekomst gebruik maken van immuuncellen van mensen met nierfalen. Deze resultaten zullen het onderzoek met proefdieren ondersteunen. Wel is het nodig om dierproeven te gebruiken om het immuunsysteem te kunnen bestuderen. Zo kunnen we naar de aanwezigheid van verschillende soorten ontstekingscellen kijken, begrijpen hoe het herstel en afbraak van het synthetisch bloedvat verloopt en hoe de rest van het lichaam daarop reageert. In kweek kunnen we deze complexe processen niet nabootsen en dus blijven dierproeven essentieel onderdeel van het project voordat we deze vaatprothesen kunnen gaan testen bij mensen.

4.2 **Vermindering**

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

Als eerste zullen we voor het begin van de proeven statistische berekeningen doen die ons vertellen hoeveel dieren er nodig zijn. In de onderzoeksgroep is veel ervaring met operaties op kleine proefdieren, waardoor we niet alleen het aantal dieren kunnen beperken maar ook het ongerief kunnen beperken. Er zijn verschillende momenten in het project ingebouwd die kunnen dienen als 'stop-moment'. Op het moment dat een proef niet verloopt zoals verwacht, zal deze worden stilgezet.

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.

De voorgestelde proeven zullen worden uitgevoerd op zowel de muis als de rat. Op beide diersoorten is heel veel onderzoek gedaan en in onze onderzoeksgroep is zowel veel ervaring met het werken met beide soorten als met de operaties.

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

We verwachten dat er matig ongerief bij de dieren kan ontstaan. Daarom zal na alle operaties pijnstilling gegeven worden aan de dieren. Vanzelfsprekend zullen de dieren tijdens de operatie voldoende verdoving krijgen en worden de operaties uitgevoerd door goedgetraind personeel.

Het getrainde personeel zal de dieren tevens nauwlettend in de gaten houden. Wanneer dieren niet goed lijken te herstellen na een operatie, zijn er verschillende maatregelen die genomen kunnen worden, zoals aanpassen van dieet, extra pijnstilling of tijdelijk apart huisvesten. Ook zal na het vervangen van het bloedvat regelmatig gecheckt worden hoe de doorbloeding bij de dieren is, om er zeker van te zijn dat alle weefsels voldoende zuurstof krijgen. Mocht een dier desondanks in conditie verslechteren dan zal het pijnloos worden gedood.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Influence of CKD on TE aortic vascular scaffolds in the rat</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Influence of CKD on TE aortic vascular scaffolds in the rat
Volgnummer	Type dierproef					
1	Influence of CKD on TE aortic vascular scaffolds in the rat					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

With these experiments, we want to study the influence of CKD versus healthy rats on tissue formation and wound healing after *in situ* TE (see outline 3.4.2).

Step a: By comparing rats with chronic kidney disease (CKD) to healthy controls, we will be able to investigate the influence of the pathology

CKD on tissue formation and wound healing after *in situ* TE.

Step b: By adding bio-functionalization to the scaffold in CKD rats versus healthy controls, we will be able to determine whether or not bio-functionalization can improve tissue formation and wound healing after *in situ* TE. Moreover, we will be able to determine whether bio-functionalization affects tissue formation and wound healing in CKD using the same mechanisms as in healthy controls.

Step c: In this decision-making step, we will compare the *in vitro* results with results from **Step a/b** to choose the most promising bio-functionalization target, which can then be used in Appendix 2 **Step e**, in an immunocompromised mouse with renal disease. This will allow us to validate the workflow and double check the importance of a promising bio-functionalization candidate in a second kidney disease model in a humanized immune environment.

To accomplish our goals, we will use adult female rats in which CKD is induced using a single surgical intervention. To assure a comparable degree of CKD, a threshold has to be reached before a scaffold shall be implanted.

By studying effects of CKD, we will be able to determine whether the alterations in function of (circulating) stem cell and the vascular and immune system in CKD will affect the process of *in situ* TE.

In this study, important ex vivo outcome variables will be measured by immunohistochemistry, qPCR and Western blot and include the effect of CKD on the presence of specific cell types in the scaffold,

With bio-functionalization we will investigate the presence of cells and cell types in healthy versus CKD animals, also compared to bare grafts.

Non-invasive longitudinal measurements include drawing blood and taking urine (assessing renal function) and determining blood pressure.

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

In these experiments we want to compare CKD versus healthy animals on outcome after *in situ* TE, with and without bio-functionalization. In **Step a/b**, a surgical model of CKD, namely 5/6th nephrectomy (SNX), will be studied in comparison to weight-matched sham-operated controls. Both in our laboratory and world-wide, the SNX model is a well-studied, reproducible model to induce CKD in laboratory rats (van Koppen et al., 2012; Cell Transplant, van Koppen et al., 2013; JOVE, Ryan et al., 2014; Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.).

Combining **Steps a/b** realizes 4 main experimental groups:

Sham + scaffold

CKD + scaffold

Sham + bio-functionalized scaffold

CKD + bio-functionalized scaffold

As a comparison for functional measurements, we will also include a small amount of non-implanted animals (e.g. n=3) [REDACTED]

To validate renal injury and reduce experimental variation, a threshold of 15 mMol/L of blood urea for established CKD has to be reached before the implantation of the experimental scaffold. 5/6th nephrectomy will be performed in a single surgical intervention. This will speed up the injury progression (unpublished observation) and limit the total amount of interventions needed for this protocol. After 5/6th nephrectomy, blood will be drawn via the tail vein every week, requiring only light inhalant anaesthesia. Blood pressure will be assessed weekly using non-invasive tail-cuff measurement, for which animals will be trained, in order to reduce stress. We have a lot of experience in reliably obtaining results from animals using this tail-cuff method. An average of 11 weeks of CKD should lead to a blood urea concentration around 15 mMol/L (van Koppen et al., 2012; Cell Transplant). In practice, when 5/6th nephrectomy is performed at 8 weeks of age, the threshold for urea is reached at an age of 19 weeks. Once the threshold of 15 mMol/L blood urea has been reached for two consecutive weeks, vascular scaffold implantation will take place in the week after the last measurement. Female rats are expected to reach 300g of body weight after 4 months of age, on the flat part of the growth curve (website Harlan), and thus females of +/- 20 weeks will have reached this body weight upon implantation. This is important because the graft cannot grow, at least not as long as it composed of non-cellular or non-cell-derived tissue. Tail cuff pressure and blood urea will also be measured at multiple time points after scaffold implantation (e.g. once a week).

[REDACTED] All *in vivo* measurements will be followed by *ex vivo* studies on isolated tissues.

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

To avoid experimental variation, all 4 main experimental groups

Sham + scaffold

CKD + scaffold

Sham + bio-functionalized scaffold

CKD + bio-functionalized scaffold

will be studied longitudinally in balanced cohorts.

In our current project, the major readout-parameter (CKD) is robust enough not to be influenced by a variety in genetic background. The variety in genetic background in patients with CKD is moreover an advantage of using this model, increasing its translational validity. While both sexes are suitable to undergo surgery, we choose to select females only. First of all, in this study we would like to select animals based on weight, rather than on age. This selection is based on the fact that we only want to implant the abdominal aorta scaffold after the (vascular) growth spurt of the animals, to prevent leakage or rupture of the scaffold. We predict that during the early phase after implantation, no growth and adaptation of the scaffold will take place due to lack of cells infiltrating the scaffold. Therefore, implantation can

only take place within the stable growth curve of the animal. Since females are generally lighter and show less rapid changes in body weight (website Harlan), female animals weighing more than 300g are preferred in this setting. Moreover, due to a lower body weight compared to males, the surgical implantation of the scaffold will be easier due to better accessibility of the aorta. The increased technical feasibility will thus decrease mortality due to technical failure.

CKD may influence the patency after aorta implantation due to changes both in blood flow and changes in thrombogenicity. While proteinuria may lead to increased thrombogenicity, CKD without excessive proteinuria may lead to bleeding tendencies. We therefore estimate that 35% of the animals with CKD will have to be killed before or after implantation but before the end of the experiment. We expect a total survival rate around 55% (maximum 5% technical failure SNX + 5% technical failure scaffold implantation + 10% CKD-related HEP +25% non-functional blood flow through scaffold, **see also Humane End Points**). For sham animals we expect a maximum 5% technical failure scaffold implantation +20% non-functional blood flow through scaffold, **see also Humane End Points**.

Summarizing:

Survival sham = 75%

Survival CKD = 55%

To minimize mortality in the sense of technical failure, training will be necessary to master the 5/6th nephrectomy and the scaffold implantation procedures. We believe that, at all times, 1 technician and 1 PhD student should have mastered both skills, since especially the abdominal aorta implantation is much more feasible when two persons work together simultaneously (own observations). Collecting data from a terminal experiment (renal clearance via PAH and Inulin measurements), also requires extensive practice. University (art.9) and HBO (art.12) students directly involved in this project also need to practice these skills, as previously discussed in our current training protocol DEC 2011.II.03.056. Based on these previous calculations and experience in how long training will take on average, we predict that we will need N=750 animals (N=150 per year, 25 per person (1 PhD, 1 technician, 2 art.9 and 2 art.12) with N=10 for SNX and N=15 for abdominal aorta end-to-end anastomosis) for training and education. Training of end-to-end anastomosis will only commence after the researcher in question has completed a microsurgery course (e.g. UMC Groningen or elsewhere) and if applicable, one animal will be used to practice both interventions in order to limit the number of animals. Is possible and available, surplus animals are used for training purposes.

The rationale for performing this study *in vivo* is fully based on previous *in vivo* and *in vitro* studies. By taking these results into account, we are able to make an accurate power calculation, thereby reducing the number of animals required. Moreover, a previous study has already shown that bio-functionalized scaffolds *in vitro* are able to increase initial monocyte recruitment in a dynamic setting (Smits et al., 2014; Cell. Mol. Med.)

On the other hand, multiple studies have shown that the regenerative potential of stem cells in CKD both *in vivo* and *in vitro* is less than in the healthy situation (van Koppen et al., 2012; Cell Transplant, Drewa et al., 2008; Transplant. Proc.).

To show how we have calculated the amount of animals necessary for our experiments, an example showing an experiment with 5 experimental groups representative of **Step b** is given.

In this example, we will only compare CKD rats.

- 1) CKD + bare scaffold
- 2) CKD + █████ scaffold
- 3) CKD + █████ scaffold
- 4) CKD + █████ scaffold
- 5) CKD + unidentified target scaffold

In a previous study we found that changing the biomaterial leads to a significant difference ██████████ marker. Since bio-functionalization experiments have previously not been performed, the change of biomaterial in this setting is taken as an approximation for this phenomenon.

In this study, the effect size was 2,21, with n=12 per group (calculated power = 0.99). As an example of primary readout, the amount of █████ is also used.

With an effect size = 2.21, Power = 0.8 and alpha = 0.05 corrected for 5 experimental groups, we calculated the amount of animals necessary using F-test for ANOVA: fixed effects, omnibus, one-way. **The outcome was n = 10**, specific for the readout parameter █████. We believe that this is also the minimum amount of animals needed to see differences in readout-parameters in our study, since variation in cellular response due to differences in genetic background may be present in our SD-model.

B. De dieren

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

To minimize the variation in our readout-parameters and to approximate the adult heterogenic patient population with CKD, the female outbred SD model based on weight is preferred. The Sprague-Dawley (SD) rat is an outbred model and Hsd:Sprague Dawley®™ (SD®™) rats are bred by Harlan in the Netherlands. Adult females only will be used. The SD rat is very easy to handle, is suitable for surgical intervention and is commonly used for 5/6th nephrectomy. When typing 'CKD' combined with a specific rat model on PubMed, hits are as follows: Lewis n=13, Wistar n=90, Sprague Dawley n=205, supporting the validity of the model.

Total N=750 animals for training and education. If possible and available, surplus animals are used for training purposes.

For **Step a**, based on a terminal group size of N=10-20 and two experimental groups (sham vs CKD),
Total N= 31 – 63 rats.

For **Step b**, we will choose the three currently known targets for bio-functionalization: ██████████ and 1 unknown candidate (or combination of known candidates) that emerges from the *in vitro* and *in vivo* data obtained in **Step a**.

Based on a terminal N= 10 – 20 per group, and 10 experimental groups

Total N= 134 – 267 for healthy rats

Total N= 181 – 364 for CKD rats

Therefore, in total for the studies described in Appendix 1 we estimate that **we will need a maximum of 1444 rats.**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

The rationale for performing this study *in vivo* will be fully based on previous *in vivo* and *in vitro* studies. Besides using blood from healthy volunteers, *in vitro* experiments may be complemented by the use of patient material (e.g. blood of CKD patients). However, *in vitro* studies alone will not suffice to act as pre-conditional input for the *in vivo* studies. *In vitro* data will not give us sufficient insight into the process of tissue formation and wound healing, due to factors such as signalling from and to the bone marrow. Thorough searches of the literature have confirmed that experiments performing *in situ* TE in diseased rodents have not been previously conducted.

To gain as much information as possible from a single animal, we will perform different types of measurements. [REDACTED]

[REDACTED] After the experiment, we will explant the scaffold to look at cellular content and tissue-specific layering. Moreover, other relevant tissues will be collected to assess morphology and cellular infiltrate. As for refinement, all surgeries will be performed by experienced surgeons. Animals will be group-housed and given cage enrichment. Moreover, a pain relief protocol after 5/6th nephrectomy has already been established with the help and approval of UU -associated veterinarians. A new optimized protocol for pain relief after implantation of the abdominal scaffold will also be included with the help of veterinarians. An optimized protocol to provide anti-thrombogenic therapy in animals lacking patent blood flow after the implantation surgery is currently in preparation together with experienced nephrologists.

As stated in **Step a**, CKD animals will first undergo surgery to implant 'bare' scaffolds. If the disease model is not compatible with the implantation of an abdominal scaffold (e.g. survival < 50%), this is considered a 'no go' moment and in close consultation with the IvD, decisions will be made concerning **Step b** and Appendix 2.

To validate renal injury and further reduce experimental variation, a threshold of 15 mMol/L of blood urea for established CKD has been

chosen before the implantation of the experimental scaffold. Due to experience and skilled personnel, CKD can be reliably and repetitively be induced. Moreover, minimizing variability will also be accomplished by using female animals only and selecting based on weight, assuring that vascular growth will not compromise the experiment. Based on previous experiments, we are able to persistently induce CKD in the rat using the 5/6th nephrectomy model (van Koppen et al., 2013; JOVE), thus minimizing mortality due to technical failure (< 5%).

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

Previously approved DEC's using the 5/6th nephrectomy model at our department have already made use of an optimized protocol for pain-relief, which will be applied for up to 48 hours after surgery. This protocol has previously been established with the help and approval of UU - associated veterinarians. A new optimized protocol for pain relief after implantation of the abdominal scaffold will also be included with the help of veterinarians. An optimized protocol to provide anti-thrombogenic therapy in animals lacking patent blood flow after the implantation surgery is currently in preparation together with experienced nephrologists. Moreover, extensive training is given to optimize the complex surgical procedures before the start of the experiment.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

After surgical intervention to induce CKD, animals may lose weight and develop inflammation or fever. During the follow-up period before animals have reached the urea threshold, general health may decline.

After implantation of the scaffold, both the site of implantation and the intestines may get infected. The inflammatory response against the synthetic scaffold is an integral part of the *in situ* TE approach. We do not expect side-effects as a consequence of the placement of a synthetic vessel.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

CKD will be induced in a single surgery. Through incisions in the flanks, one kidney will be removed as a whole while the poles of the second kidney will be cut. During recovery, rats may develop inflammation of the incision sites and/or fever. During follow up general health may decline due to build-up of toxins in the blood, normally cleared by the kidney.

During the implantation surgery, the intestines have to be removed from the abdominal cavity to allow access to the aorta. This may lead to intestinal infections post-surgery. The incision length over the linea alba stretches from just below the diaphragm until the genital area and may also get infected after closure.

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

All surgeries will be performed by experienced staff (2 persons simultaneously), to decrease overall surgery time and specifically the ischemia-time. After implantation of the scaffold, patency of the scaffold will be assessed while the animals are still under anesthesia. When patency cannot be assured due to the presence of a thrombus, anti-thrombotic therapy (e.g. Plavix) can be administered. Animals that show patency of the graft will still be checked the first 7 days for hind-limb ischemia (see J, humane eindpunten).

Moreover, all animals will be monitored closely after implantation surgery for changes in general clinical characteristics. Animals will be checked for motility and cleaning behavior. Weight and temperature will also be monitored. Possible interventions in animals with altered clinical characteristics include individual housing, altered diet (water-based powder chow) and an increased or prolonged amount of analgesia. In close consultation with the IvD, animals that show no improvement in health will be excluded and killed.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Our first HEP (1) will consist of assessing general characteristics during follow-up of CKD but before scaffold implantation. Animals will be checked for motility and cleaning behavior, weight, temperature and raised fur. Our second HEP (2) will consist of assessing the patency of the aortic scaffold directly after implantation but while the animal is still under anaesthesia. In the patency of the graft does not improve after anti-thrombogenic therapy and when the hind limbs of the animals appear to remain ischemic (cold, pale), the animal will be excluded and killed. Our third humane-endpoint (3) will consist of assessing limb-function at Day 1,2,3,5 and 7 after implantation surgery using the cage-lid test. If one of the limbs fails this test, the animal will also be excluded and killed. The fourth HEP (4) will consist of monitoring weight loss, infection and general health after implantation, with the same exclusion criteria as HEP (1).

Moreover, when general clinical characteristics change and we expect the discomfort to shift from 'matig ongerief' to 'ernstig ongerief', such as an acute drop in weight (15% or more in 2 days), a humane endpoint is also reached. We will thus humanely kill all animals within 'matig ongerief' expected to deteriorate in health in such a way that 'ernstig ongerief' will be reached.

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

The study is designed to restrict discomfort as much as possible and apply HEPs when necessary. During this experiment, we expect only a low mortality of animals. Both technical failure of 5/6th nephrectomy (SNX) and technical failure of scaffold implantation are thought to occur in less than 5% of the animals (own observations) when performed by skilled micro surgeons. However, we do expect it is necessary for a part of the animals to be killed before the end of the experiment, both to prevent increased discomfort ('ernstig ongerief') and mortality. So there is a clear distinction between interim model-related mortality (which we prevent as much as possible by assessing humane-end points), technical failure (which will be low) and reaching a humane-end point (HEP, which will be assessed).

Our first HEP (1) will consist of monitoring general health after induction of CKD but before implantation of a vascular scaffold. Our second HEP (2) will consist of assessing the patency of the scaffold after implantation. For the implantation of the vascular scaffold, it is necessary to temporally clamp the aorta to prevent bleeding. In some cases, this ischemia and subsequent reperfusion can lead to irreversible damage in downstream tissues of the abdominal aorta. A clear example of this damage is paralysis of the hind legs. If the scaffold fails to be patent, for instance due to thrombus formation and anti-thrombogenic therapy does not improve the patency, the animal will be excluded and killed. A previous study on healthy SD rats showed patency of 85% 4-8 weeks after implantation of an abdominal aorta scaffold [34]. We estimate 15% of this 20% sham (or 20% of 25% CKD) will be excluded during surgery after anti-thrombogenic therapy and 5% after a positive cage-lid test. The 5% will be tested at several time points after the implantation surgery and excluded whenever the cage-lid test is positive for one or more limbs. To prevent this mortality and increased discomfort due to ischemia in downstream targets of the aorta,

we choose to implement the cage-lid test and actively prevent mortality, taking animals out of the study that are at risk of increased discomfort.

Our third humane-endpoint (3) will consist of assessing limb-function at Day 1,2,3,5 and 7 after implantation surgery using the cage-lid test. If one of the limbs fails this test, the animal will also be excluded and killed. The fourth HEP (4) will consist of monitoring weight loss, infection and general health after scaffold implantation.

The most common signs of increased discomfort in the current study will be:

- 1)Paralysis of the hind limbs, visible in the first days after the implantation of the vascular scaffold
- 2)Persistent infection of the abdominal region after placement of the vascular scaffold
- 3)Paralysis of other limbs and necrosis of tissue due to occlusion of the vascular scaffold

All these signs will serve as exclusion criteria and the animals will subsequently be killed to prevent increased discomfort and mortality.

CKD may influence the patency after aorta implantation and may influence the healing process. We therefore estimate that an additional 20% of the animals with CKD will have to be killed before the end of the experiment. This would mean that we estimate 45% of CKD animals will be killed before the end of the study, while 25% of the sham animals will be killed before the end of the study.

K. Classificatie van ongerief

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

This experiment is determined as 'matig ongerief'. All animals will undergo two surgical events (induction of kidney disease or sham and scaffold implantation) plus follow-up . Reaching the urea threshold of renal disease is expected to vary between animals, with an average of 11 weeks. Side effects of developing CKD may include weight loss and overall decreased wellbeing (raised fur). Animals that will be excluded and killed during the implantation will either experience 'matig ongerief' (CKD) or 'licht ongerief' (sham) due to preceding sham or surgical event. Animals excluded during surgery (estimated 15% sham en 20% CKD) will not experience extra discomfort since they will be killed under anesthesia. The remaining 5% will be tested at several time points after the implantation surgery and excluded whenever signs of paralysis emerge. Since the first 48h after surgery, analgesia will be given and 2 cage-lid test are performed during this time-frame, we estimate the discomfort of these animals 'matig ongerief' (both sham and CKD).

As described, we want the animals in this experiment to have a maximum of 'matig ongerief', due to the nature of the interventions and the duration of the experiments. All animals with deteriorating health will be humanely killed before reaching 'ernstig ongerief'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Animals will be killed approximately [REDACTED] after implantation and extensive work will be conducted on morphology of the scaffold using immunohistochemistry [REDACTED] and specific (Western Blot (WB) and quantitative expression (qPCR)). Other relevant tissues (e.g. heart, bone marrow, kidney and aorta remnant) will also be collected to assess weight, morphology and cellular infiltrate. Longitudinal, terminal and post-mortem measurements will allow correlation between morphology of the scaffold and expression profiles in CKD versus control animals with and without bio-functionalization.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table border="1"><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Infiltration and early tissue formation of tissue-engineered aortic vascular scaffolds in a humanized mouse model with renal disease</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	2	Infiltration and early tissue formation of tissue-engineered aortic vascular scaffolds in a humanized mouse model with renal disease
Volgnummer	Type dierproef				
2	Infiltration and early tissue formation of tissue-engineered aortic vascular scaffolds in a humanized mouse model with renal disease				

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

With these experiments, we want to study the influence of human-derived stem cells in an immunocompromised mouse on tissue formation and wound healing after *in situ* TE (see outline 3.4.2).

Step a: In this decision-making step, we will determine which mouse is best suitable for the current project. We will have to

choose between higher engraftment of human cells and a more favorable outcome after scaffold implantation. In this context, the sex of the animal seems irrelevant and both sexes will be able to be used to reduce the amount of animals. Moreover, the mouse should be susceptible to developing renal disease. This choice will be made in consultation with experts in the field.

Step b: By transplanting human stem cells into the chosen mouse without a functional immune system (immunocompromised), we will be able to quantify the origin of the cells found in the scaffold. In theory, all human cells found in the scaffold will originate from circulation-derived immune cells and all murine-derived cells originate from tissue-resident cells in the proximity. Using immunohistochemistry, we will compare total cellular content in the scaffold of immunocompromised mice with and without stem cell transplantation to quantify the contribution of circulation-derived cells in in situ TE. We will also be able to double-stain human markers and murine marker

measuring blood pressure using non-invasive tail-cuff measurement will be performed longitudinally.

Step c: By adding bio-functionalization to the scaffold, we will be able to determine whether or not the origin of attracted cells found in the scaffold differs compared to bare scaffolds, using the same techniques as in **Step b**. Moreover, we will be able to determine whether bio-functionalization positively affects tissue formation and wound healing in this mouse

Step e: By studying the humanized mouse with and without renal disease, we can distinguish the influence of both the immune system and renal disease on the outcome of tissue formation and wound healing. Moreover, we will be able to quantify the origin of the cells found in the scaffold in both circumstances (circulation- or tissue derived in health and disease), using the same techniques as **Step b** and **Step c**. Renal disease progression will be longitudinally monitored by taking blood and urine samples. By also adding the most promising bio-functionalization target to renal disease mice, we will be able to study the effect of renal disease on the tissue formation and wound healing in presence of a bio-functionalization target. This will allow us to validate the workflow and double check the importance of a promising bio-functionalization candidate in a second kidney disease model in a humanized immune environment.

To accomplish our goals, we will use an immunocompromised mouse transplanted with human stem cells (hematopoietic stem cells, CD34+) after irradiation to inactivate the immune system. By studying human- and mouse markers in the scaffold, we can characterize the contribution of different cell-types and their source. Renal disease will be induced for instance by supplying deoxycorticosterone acetate (DOCA) with a S.C. implant and adding salt to the diet (Fontes et al., 2015; *Cardiorenal Med.*). In the mouse, we have chosen a different renal disease induction than used in the CKD rat. Besides the fact that mice in general are less susceptible to developing renal disease using the surgical method, we believe that a surgical intervention in our humanized mice will lead to higher mortality. Therefore a non-surgical method leading to renal disease is preferred. In this study, as described above, important outcome variables include the effect of bio-functionalization and renal disease on the presence of human cells in the scaffold.

As clarified in 3.4.2 and 3.4.3, the experimental part of this project will only commence after we have completed **Step (c) of Appendix 1**, so we can apply both the technical advances and

knowledge.

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

In this project we want to compare a humanized model to age-matched immunocompromised mice (Step (b) and (c)). There are several suitable mice into which human cells can be introduced, e.g. SCID/Bg mice, RAG2 $-/-$ γc $-/-$, NOD/SCID/IL-2R γ null (NSG), see van Rijn et al., 2003; Immunobiology for overview and **Figure 1**.

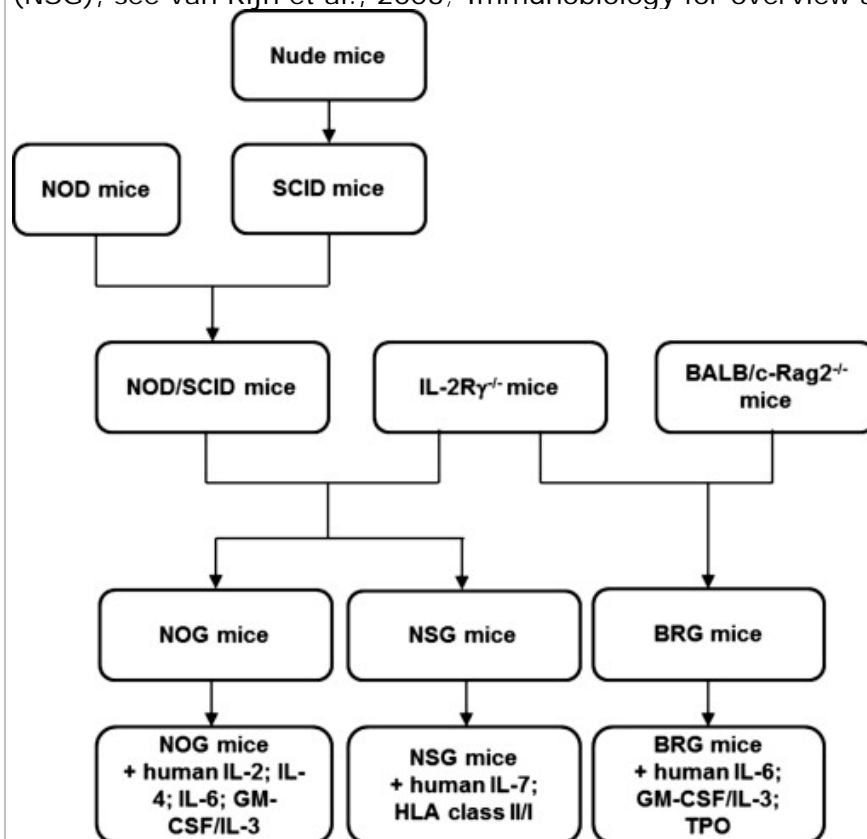


Figure 1: A simplified schematic overview of the historical development of various immunodeficient mice for

humanized mouse models (Denayer et al., 2014; New Horizons Transl. Med.)

By introducing human stem cells in these mice, we can study the contribution of human cells versus murine cells. The most important decision-making step is to select the appropriate model for this project. In the decision-making phase (**Step a**) we have to choose between a higher engraftment of human cells or to a more favorable outcome after *in situ* TE. This is explained by the fact that the less effective the immune system is, the more human cells will be able to engraft. However, a very weak immune system will not be able to adequately react to implantation of a scaffold, since the response to injury (and thus healing) is also abated. In the decision-making phase, we will choose which approach is most relevant for our study question and which model is most suitable for this purpose. During this phase, the sensitivity of the model to develop renal disease also has to be taken into account.

When this mouse model is established, we will wait with the vascular scaffold implantations until **Step c of Appendix 1** has been completed (see also work flow Figure in 3.4.3.). Once a most effective bio-functionalized target has been chosen in Appendix 1, we can implant a vascular scaffold and determine (**Step b**) the effect of a human circulation on scaffold outcome.

In Step b, we will first sub lethally irradiate the mice. Dose and duration will be based on the chosen mouse. On the same day after irradiation, stem cell transplantation will be performed, dose will also be dependent on the mouse and may be optimized in a pilot-study. Chimerism (percentage of human cells engrafted in the mouse) will be measured approximately 3 months post-transplantation. Before the scaffold is implanted, baseline measurements will be taken including non-invasive blood pressure, blood and urine. Approximately [REDACTED] after the implantation, the animals will be terminated. To gain as much information as possible from a single animal, we will perform different types of measurements. [REDACTED]

[REDACTED] After the experiment, we will explant the scaffold. Moreover, other relevant tissues (spleen, heart, remnant aorta and bone marrow) will be collected to assess morphology and cellular infiltrate and chimerism. Longitudinal non-invasive monitoring may consist of collecting blood and/or urine and determining blood pressure (e.g. every week).

As stated in **Step b**, animals will first undergo surgery to implant 'bare' scaffolds, after a model has been established. If the model is not compatible with the implantation of an scaffold (e.g. survival < 50%), this is considered a 'no go' moment and in close consultation with the IvD, decisions will be made concerning following steps.

In Step c, we can determine the influence of different bio-functionalization targets [REDACTED] of the scaffold on functional outcome. The experimental set-up and readout parameters will be similar to **Step b**. In combination with the results of Appendix 1, we will choose the most functionally effective bio-functionalized scaffold to proceed to a model of renal disease (**Step e**).

In Step e, renal disease will be induced on top of the methods described in **Step b/c**. DOCA and high-salt will be given for approximately 8 weeks before sub lethal irradiation and stem cell transplantation. After the mice have recovered from the transplantation, DOCA-salt diet will be started again and maintained until the end of the experiment. Similar to **Step b/c**, the implantation will take place approximately 3 months after stem cell transplantation. The scaffold will be explanted approximately

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

To minimize technical failure, experimental surgery in Appendix 2 will only commence after experiments in Appendix 1 have been completed. This will ensure increased technical skills plus experience in working in a disease model.

To avoid experimental variation, all groups will be studied longitudinally in balanced cohorts until the total group size matches the power analysis on the main outcome variables. Important outcome variables include the presence of human cells in the scaffold,

Minimizing the number of animals is partially determined by **Step a**, choosing a model. We will first focus on comparing existing models in engraftment and survival after sub lethal irradiation, and reconstitution with human bone marrow, both by meta-analyzing available literature and talking to experts in the field who have experience with breeding, housing and maintaining these animals.

Animals in the transplantation group will only be included into the experiment when chimerism exceeds >20% 3 months after stem cell transplantation. Animals that do not reach the chosen threshold will be excluded. It is estimated that about 90% of the animals will show >20% engraftment (van Rijn et al., 2003; Immunobiology). Rejection of the humane stem cells may result in acute graft-versus-host-disease (aGvHD) and development of aGvHD is dependent on multiple factors (Schroeder and DiPersio, 2011; Dis Model Mech). GvHD accounts for 15–30% of deaths that occur following allogeneic stem cell transplantation (Ferrara et al., 2009; Lancet). To prevent aGvHD, irradiation levels should be minimalized but the mice strain here is again of importance and should be discussed with experts in the field. Decreased survival and reaching of a humane-endpoint (HEP) is however to be expected in these experiments, due to follow-up after irradiation and aGvHD after bone marrow-transplantation and scaffold implantation. We also expect to see scaffold-placement dependent reaching of HEP due to (partially) defective wound healing in bone marrow-reconstituted animals and due to paralysis. Irradiation mortality (or other technical failure) and reaching of HEP during follow-up is expected to range from 20% to 50%, depending on the ultimate dose and strain used (Mazurier et al., 1999; J Interferon Cytokine Res.). While non-reconstituted animals will be not be able to develop aGvHD, reaching of HEP and mortality is assumed to be lower.

Thus, we estimate a total survival of 50% for the CD34+ group and 70% for CD34- group.

To show how we have calculated the amount of animals necessary for our experiments, an example showing an experiment with 5 experimental groups representative of **Step c** is given.

In this example, we will only compare humanized animals. A mouse without a functional immune system but transplanted with human stem cells is indicated as 'CD34+' (human hematopoietic stem cells positive) in this scheme.

- 1) CD34+ + bare scaffold
- 2) CD34+ + scaffold
- 3) CD34+ + scaffold

- 4) CD34+ + [REDACTED] scaffold
- 5) CD34+ + unidentified target scaffold

In a previous study, we found that changing the biomaterial leads to a significant difference in [REDACTED]

[REDACTED] Since bio-functionalization experiments have previously not been performed, the change of biomaterial in this setting is taken as an approximation for this phenomenon. In this study, the effect size was 2,21, with n=12 per group (calculated power = 0.99). As an example of primary readout, the number of [REDACTED] positive cells is used.

With an effect size = 2.21, Power = 0.8 and alpha = 0.05 corrected for 5 experimental groups, we calculated the number of animals necessary using F-test for ANOVA: fixed effects, omnibus, one-way. **The outcome was n = 10**, specific for the readout parameter [REDACTED]. However, depending on the model of choice, the [REDACTED] cell presence may be altered in our model. Therefore, we believe that the total n should be increased compared to the calculated amounts.

B. De dieren

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

Choice of model, origin and age

Step a will function as our 'go/no go' moment in this project, which will be in close consolidation with the IvD. Irrespective of the chosen model, animals will be ordered from an official breeder, preferably national. The sex of the animal in this experiment is not thought to play an important role and therefore both sexes will be used.

Step b will realize 2 experimental groups; immunocompromised model + scaffold (CD34-) versus human stem cell reconstituted mice (CD34+) + scaffold. Irradiation and transplantation will take place in adult animals, to correct for older age in animals receiving the DOCA + salt treatment in **Step e**.

Amount of animals

For **Step b**, based on a terminal group size of N=15 - 25 and 2 experimental groups

Total N= 30 - 50 for CD34+

Total N=21 - 35 for CD34-

For **Step c**, we will choose three currently known targets for bio-functionalization: [REDACTED] and 1 unknown candidate (or combination of known candidates) that emerges from the *in vitro* and *in vivo* data obtained from Appendix 1 **Step a/b**. Based on a terminal group size of N=15 - 25 and 10 experimental groups

Total N= 300 - 500 for CD34+

Total N= 215 - 360 mice for CD34-

For **Step e**, we will choose the most effective bio-functionalization target based on **Step c** Appendix 1 and **Step d** Appendix 2.

Based on a terminal group size of N=15 - 25 and 4 experimental groups

Total N= 60 - 100 mice for CD34+

Total N= 42 – 71 mice for CD34-

Therefore, in total for the studies described in Appendix 2 we estimate that we will need a **maximum of 1116 mice**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Multiple immunocompromised mice are available for this type of research. However, the introduction of a human circulation is not straightforward and efficacy of engraftment is strain-dependent. Depending on the genetic mutation, some strains are more or less prone to engraft human cells and develop side-effects such as acute graft-versus-host disease (van Rijn et al., 2003; Immunobiology). Moreover, these strains may differ in their susceptibility to develop renal disease. It is thus important to select the right model to realize **Step b – e**. Currently, we are uncertain which model is most suitable for this project. Once we know which percentage of engraftment we can realize without abating the response to injury too much, we can make our decision.

The rationale for performing this study *in vivo* will be based on previous *in vivo* and *in vitro* studies. All our *in vivo* data will be complemented in parallel with *in vitro* data. However, *in vitro* data alone will not give us sufficient insight into this process, due to factors such as signalling from and to the bone marrow, and the effect of renal disease on all these processes. Such factors are only present *in vivo*.

To reduce the total amount of animals (surplus), both sexes will be used during this experiment. As for refinement, all surgeries will be performed by experienced surgeons. Animals will be group-housed and given cage enrichment if possible. Irradiation and stem cell transplantation will be performed in consolidation with experts in the field. A optimized protocol for pain relief after implantation of the abdominal scaffold will also be included with the help of veterinarians. An optimized protocol to provide anti-thrombogenic therapy in animals lacking patent blood flow after the implantation surgery is currently in preparation together with experienced nephrologists.

It is well known that the immune response of mice is not completely congruent with that of humans (Mestas and Hughes, 2004; J. Immun.). Thus in mice, inflammatory processes in response to *in situ* TE scaffold implantation may not be fully representative of the human situation.

To approximate the clinical situation as much as possible, we believe that a humanized mouse can help in answering our research questions. Humanized mouse models are considered extremely useful as they permit functional research studies *in vivo* and hence support clinical translation. Immunocompromised mouse models transplanted with human stem cells have not been used to assess functional outcome in *in situ* TE yet. Moreover, inducing renal disease in such models has also not been performed previously (Searched on PubMed). Therefore, our studies are innovative and will be able to answer fundamental questions concerning *in situ* TE in health and disease.

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

Currently, we are working on collaborations to determine the optimal mouse for this project. There are multiple centers that have experience with working with immunocompromised animals. They will be able to advise us on optimal irradiation doses, post-irradiation care, commonly seen side effects and susceptibility of these models to renal disease. Extensive training is given to optimize these complex surgical procedures before the start of the experiment.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

After sub lethal irradiation, animals may lose weight and develop inflammation specifically of the intestinal tract

After stem cell transplantation, animals may develop acute graft-versus-host disease (aGvHD)

After implantation of the scaffold, both the site of implantation and the intestines may get infected.

After implantation of the scaffold, animals may experience discomfort due to pain and paralysis

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Lethal irradiation can directly affect cells in mitosis (cell division), since it causes DNA-damage. Besides the cells of the immune system and the bone marrow, cells from the intestinal tract are very sensitive to irradiation. Irradiation may induce cell damage, which in turn leads to inflammation (Robbins et al., 2015; Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.) and subsequent weight loss.

After stem cell transplantation, activated donor (human) T cells traffic and cause cytotoxicity in the gut, skin, liver, lung, thymus and lymph nodes (Schroeder and DiPersio, 2011; Dis. Model. Mech.).

During the implantation surgery, the intestines have to be removed from the abdominal cavity to allow access to the aorta. This may lead to intestinal infections post-surgery. The incision length over the linea alba stretches from just below the diaphragm until the genital area and may also get infected after closure.

After the implantation surgery, a thrombus from the aorta may get stuck in smaller arteries, resulting in pain. A larger thrombus may obstruct a larger artery (e.g. arteria femoralis) leading to paralysis of (a) hind limb(s).

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

Experienced personnel will perform sub lethal irradiation and stem cell transplantation will be performed by experienced personnel and optimized in small pilot study.

All animals will be monitored closely after sub lethal irradiation, stem cell transplantation and implantation surgery for changes in general clinical characteristics. Mice are known to be able to lose up to 25% of body weight within 14 days after irradiation.

Mice receiving total body irradiation and a bone marrow transplant will lose 10% to 20% of total body weight within the first 4 or 5 days, but then recover. Mice undergoing aGvHD will have a similar initial drop in weight but will recover more slowly or will undergo a continuing decline in weight (Hakim et al., 2011; Curr. Protoc. Immunol.). After irradiation and stem cell transplantation, up to 21 days, mice will be checked every other day by the responsible investigator. Animals will be checked for motility and cleaning behavior, weight, temperature and loss of fur. Possible interventions in animals with altered clinical characteristics include individual housing, altered diet (water-based powder chow) and an increased or prolonged amount of analgesia. Salt can also temporarily be retracted from the diet in renal disease animal. In close consolidation with the IvD, animals that show no improvement in health will be excluded and killed.

All surgeries will be performed by experienced staff (2 persons simultaneously), to decrease overall surgery time and specifically the ischemia-time. After implantation of the scaffold, patency of the scaffold will be assessed while the animals are still under anesthesia. When patency cannot be assured due to the presence of a thrombus, anti-thrombotic therapy (e.g. Plavix) can be administered. Animals that show patency of the graft will still be checked the first 7 days for hind-limb ischemia (see J, humane eindpunten).

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tight evaluation of the animals will be performed to prevent mortality. Our first HEP (1) will be follow-up after irradiation and stem-cell transplantation. Irradiation-related side effects include weight-loss, intestinal bleeding, infection and anaemia (Robbins et al., 2015; Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.). Stem-cell transplantation related side effects include weight-loss, ruffling of hair and decreased mobility. If there is a decrease in weight (> 25% within the first week or acute drop 15% or more in 2 days) and/or a combination of other symptoms, the animal will be excluded and killed. Our second HEP (2) will consist of assessing the patency of the aortic scaffold after implantation. In the patency of the graft does not improve after anti-thrombotic therapy and when the hind limbs of the animals appear to remain ischemic (cold, pale), the animal will be excluded and killed. Our third humane-endpoint (3) will consist of assessing limb-function at Day 1,2,3,5 and 7 after implantation surgery using the cage-lid test. If one of the limbs fails this test, the animal will also be excluded and killed. The fourth HEP (4) will consist of monitoring weight loss, infection and general health after implantation, with the same exclusion criteria as HEP (1).

The most common signs of increased discomfort in the current study will be:

- 1) Irradiation and stem-cell transplantation related side-effects, most likely weight-loss
- 2) Paralysis of the hind limbs, visible in the first days after the implantation of the vascular scaffold
- 3) Persistent infection of the abdominal region after placement of the vascular scaffold

4) Paralysis of other limbs and necrosis of tissue due to occlusion of the vascular scaffold

All these signs will serve as exclusion criteria and the animals will subsequently be killed to prevent increased discomfort and mortality. No direct side effects are expected from the DOCA-salt model, but the hypertension could initially impact on implantation surgery.

For the implantation of the vascular scaffold, it is necessary to temporarily clamp the aorta to prevent bleeding. In some cases, this ischemia and subsequent reperfusion can lead to irreversible damage in downstream tissues of the abdominal aorta. A clear example of this damage is paralysis of the hind legs. To evaluate hind-limb paralysis, the cage-lid test will be performed. If the cage-lid test is positive and either one of more limbs fail to grab, a humane endpoint will be reached and the animal will be humanely euthanized.

Moreover, when general clinical characteristics change and we expect the ongerief to shift from 'matig ongerief' to 'ernstig ongerief', such as an acute drop in weight (15% or more in 2 days), a humane endpoint is also reached. We will thus humanely kill all animals within 'matig ongerief' expected to deteriorate in health in such a way that 'ernstig ongerief' will be reached. If 21 days after irradiation weight is not back to pre-irradiation levels, a humane endpoint is also reached.

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

Decreased survival is to be expected, both due to irradiation and bone marrow-transplantation and due to scaffold implantation. Irradiation mortality and reaching HEP during follow-up is expected to range from 20% to 50%, depending on the ultimate dose and strain used [45]. We also expect animals to reach HEP due to scaffold-placement dependent thrombus formation due to (partially) defective wound healing in BM-reconstituted animals and due to paralysis. We expect an average of 15% of the implanted animals to reach this HEP, with 10% excluded during surgery after anti-thrombogenic therapy and 5% after a positive cage-lid test. The remaining 5% will be tested at several time points after the implantation surgery and excluded whenever the cage-lid test is positive for one or more limbs.

CD34- animals will undergo irradiation (15% HEP (1)) + scaffold implantation and follow up (15% HEP 2,3,4).

CD34+ animals will undergo irradiation (15% HEP (1)) + stem-cell transplantation (20% HEP (1) due to GvHD) + scaffold implantation and follow up (15% HEP (2,3,4)).

Thus we estimate a humane endpoint for 50% of the CD34+ group and 30% of the CD34- group.

K. Classificatie van ongerief

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

This experiment is determined as 'matig ongerief'. All animals will undergo sub lethal irradiation and one surgical event plus short-term follow up (scaffold implantation). Some of the animals will also undergo stem cell transplantation. Induction of renal disease is not expected to give any side effects. Animals that will be excluded and killed during the implantation will also experience 'matig ongerief' due to preceding irradiation with or without stem cell transplantation. Animals excluded during surgery (estimated 10%) will not experience extra discomfort since they will be killed under anesthesia. The remaining 5% will be tested at several time points after the implantation surgery and excluded whenever signs of paralysis emerge. Since the first 48h after surgery, analgesia will be given and 2 cage-lid test are performed during this time-frame, we also estimate the discomfort of these animals 'matig ongerief'.

As described, we want the animals in this experiment to have a maximum of 'matig ongerief', due to the nature of the

interventions and the duration of the experiments. All animals with deteriorating health will be humanely killed before reaching 'ernstig ongerief'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Animals will be sacrificed at [redacted] after implantation since extensive work will be conducted on morphology of the scaffold using immunohistochemistry [redacted] and specific (Western Blot (WB) and quantitative expression (qPCR) respectively. Longitudinal, terminal and post-mortem measurements will allow correlation between morphology of the scaffold and expression profiles in humanized and control animals.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.547.021
2. Titel van het project : Influence of metabolic risks on aortic vascular graft in situ tissue engineering
3. Titel van de NTS : De invloed van nierfalen op weefselconstructie van bloedvaten

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: 25-06-2015
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 08-07-2015 en 26-08-2015
 anderszins behandeld: 16-09-2015
 termijnonderbreking(en) van / tot : 14-07-2015 tot 14-08-2015
03-09-2015 tot 16-09-2015
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 03-11-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 26-08-2015
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5 DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: Aanvrager
- Strekking van de vragen:
 - Zijn er lijnen met de kliniek om te kijken of het ook in de patiënt werkt?
 - Waar komen de grafts vandaan?
 - Is trombose te voorkomen?
 - Voor de andere vragen die gesteld zijn en de bijbehorende antwoorden verwijst de DEC graag naar de correspondentie met de aanvrager die tussen 03-09-2015 en 16-09-2015 heeft plaatsgevonden.
- Strekking van de antwoorden:

- Ja, er zullen in vitro experimenten uitgevoerd worden met bloed van gezonde mensen en – in een later stadium – met bloed van patiënten met chronisch nierfalen.

[REDACTED]

[REDACTED]

- Ja, het is in sommige gevallen mogelijk om met behulp van heparine thrombusvorming te voorkomen. Het is echter nog niet duidelijk wat hiervoor het optimale tijdstip is: voorafgaand aan de ingreep of na het inhechten van de scaffold. In overleg met een ervaren nefroloog zal een adequaat protocol opgesteld worden.

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 14-07-2015

- Strekking van de vragen:

- De DEC vindt uw aanvraag moeilijk toegankelijk dus moeilijk leesbaar mede vanwege de lengte en adviseert u deze nog eens helemaal door te nemen en sterk in te korten.

- Wat wordt bedoeld met 'effecten van biofunctionalisering'? Graag toelichten.

- 3.1 Achtergrond: De DEC heeft problemen met het te gebruiken model. De ratio voor het gebruik van dit nierfalenmodel is niet helder. De DEC zich af waarom u nierfalen als een westerse ziekte benoemt en waarom u specifiek voor deze aandoening kiest. Dit lijkt de DEC een willekeurige keuze. Graag beter motiveren.

- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af wat de resultaten waren van uw vorige studie, waarbij u het [REDACTED] gebruikt heeft. Wat voegt deze studie toe in relatie tot die resultaten en hoe verhoudt dit model zich tot, bijvoorbeeld, een model voor hartfalen, diabetes of alzheimer? Graag toelichten.

- Datum antwoord: 14-08-2015

- Strekking van de antwoorden:

- Ik begrijp dat de inhoud van de aanvraag problemen oplevert. Het veld van tissue engineering (TE) is relatief nieuw en is gestoeld op veel kennis omtrent stamcel functie, wondheling en circulerende cyto- en chemokinen. Daarnaast wordt in deze aanvraag ook de component van nierfalen geïntroduceerd. Om de aanvraag duidelijker en leesbaarder te maken is de tekst nu meer gericht op de einddoelen van het project in combinatie met de rationale van de aanvraag. Ook is er een schema toegevoegd waarin de 'workflow' duidelijk wordt uitgelegd. De belangrijkste boodschap uit dit schema is dat de experimentele proeven zullen worden gestart in de chronisch nierfalen (CKD) rat, waardoor additionele (technische) ervaring kan worden opgedaan met aorta anastomose in een ziektemodel. Samenvattend betekent dit dat proeven met een model met een hoger risico pas later in de aanvraag zullen worden gestart. Ofwel, pas nadat de rattenproeven een effectieve kandidaat hebben opgeleverd wat betreft biofunctionalisatie (zie volgende vraag), zal gestart worden met de gehumaniseerde muizenproeven. Ook hier is bewust gekozen om het ziektemodel CKD helemaal naar achter te verplaatsen, om eventuele technische problemen (o.a. aangetaste

vaten) omtrent de implantatie-chirurgie zo goed mogelijk te kunnen laten verlopen. In overleg met de IvD is gekozen voor de huidige opzet.

- Bio-functionaliseren, ofwel het toevoegen van cyto- en chemokinen aan de synthetische scaffold, leidt tot een versnelde en effectievere wondhelingsreactie en weefselformatie na implantatie van de scaffold. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

- In de huidige versie van de aanvraag is meer zorg besteed aan onderliggende (niet-conventionele) risicofactoren die gepaard gaan met nierfalen en waarom deze interessant zijn voor in situ tissue engineering. Er is veel gegrond bewijs dat in patiënten met nierfalen, het immuunsysteem, het vaatsysteem en de stamcelfunctie is aangetast. Juist deze drie componenten zijn belangrijk voor het werkingsmechanisme van in situ TE; het aantrekken van cellen uit het beenmerg en de circulatie, welke vervolgens ontsteking en wondheling kunnen initiëren. Als de wondheling plaats heeft gevonden, zal een functioneel weefsel achterblijven. Mocht echter het aantrekken van stamcellen niet functioneel zijn, of wondheling verstoord zijn, dan werkt in situ TE wellicht niet. Tot op heden is dat nog door niemand onderzocht. Een interessante toepassing voor in situ TE is het maken van bloedvaten. Vasculaire toegang voor dialyse patiënten is dus een potentiële toepassing. Daarnaast zullen ook voor andere applicaties (b.v. voor de vervanging van hartkleppen), patiënten met nierfalen veelvuldig voorkomen. Conventionele risicofactoren (zoals hypercholesterolemie en atherosclerose) spelen vermoedelijk een minder belangrijke rol dan niet-conventionele risicofactoren zoals dyslipidemie (afwijkend HDL), arteriosclerose (media calcificatie) en de effecten op zowel het immuunsysteem en het vaatsysteem van hoge concentraties van veelal onbekende stoffen die normaal worden uitgescheiden door de nier (zgn. uremische toxinen). Omdat het werkingsmechanisme in situ TE gestoeld is op het correct functioneren van het vasculaire systeem, het immuunsysteem en de functie van stamcellen, is nierfalen, met zijn toenemende incidentie in alle lagen van de westerse bevolking, een zeer relevante pathologie voor dit onderzoek.

- Ter verheldering zou ik graag willen onderstrepen dat de ApoE muis atherosclerose ontwikkelt en geen arteriosclerose. Arteriosclerose (verdikken en verharderen van de bloedvatwanden, met gevolg het verliezen van elasticiteit) en arteriosclerose (media calcificatie in kleinere vaten en arteriolen) zijn beide risicofactoren die voorkomen als gevolg van chronisch nierfalen. Atherosclerose, zoals in ApoE, is een specifieke vorm van arteriosclerose die gepaard gaat met de accumulatie van vette plaques en cholesterol in de vaatwand. Hoewel alle drie de termen dus aan elkaar verwant zijn, hebben zij een andere betekenis.

Zoals boven gesteld zijn conventionele risicofactoren die gepaard gaan met atherosclerose en plaque formatie voor het merendeel verschillend met de risicofactoren voor patiënten met nierfalen, die veelal lijden aan arteriosclerose ofwel vasculaire verkalking. Bovendien, omdat

[REDACTED]

[REDACTED] Het uiteindelijke voordeel hiervan is dat implantatie van een scaffold in een ziektemodel eerst geoptimaliseerd kan worden in de CKD rat, met een grotere diameter. Het implanteren van de graft in een CKD muis zonder immuunsysteem, wat technisch het meeste problemen zal opleveren, is ook om die redenen als laatste gepland.

Modellen voor metabool syndroom en/of diabetes zijn ook zeer relevant en worden momenteel getest aan de Technische Universiteit van Eindhoven. Resultaten en technische problemen omtrent chirurgie in deze ziektemodellen zullen tevens onderling worden besproken.

Vasculaire veranderingen in alzheimer, zijn primair gerelateerd aan veroudering en betreffen de cerebrale circulatie. De incidentie van alzheimer wordt niet duidelijk beïnvloed door chronisch nierfalen.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

- Datum: 03-09-2015
- Strekking van de vragen:
 - Naar aanleiding van uw presentatie is het de DEC nu helder waarom u kiest voor het nierfalenmodel. De DEC verzoekt u dit ook in het projectvoorstel nog duidelijker uit te leggen waarom u kiest voor het nierfalenmodel in plaats van, bijvoorbeeld, het vaatmodel.
 - Met betrekking tot het inbrengen van de grafts en het proces van regeneratie verzoekt de DEC u in het projectvoorstel de sequentie van gebeurtenissen en metingen uitgebreider weer te geven. Tevens graag opnemen wat de ex vivo parameters zijn, de afstotingsrisico's, de ontstekingsrisico's, etc.
 - De DEC verzoekt u ook in het projectvoorstel ook aan te geven waarom een scaffold soms niet bekleed wordt met cellen, welk percentage dat is en het behorende ongerief in te schatten. Het ongerief voor de dieren die uit de proef worden gehaald is waarschijnlijk licht i.p.v. matig. U kunt hierover contact opnemen met de IvD.

- Datum antwoord: 16-09-2015
- Strekking van de antwoorden:
 - Op pagina 2 en pagina 3 van de projectaanvraag, 3.1. Achtergrond, kopje 'Rationale for CKD in TE', is een uitgebreidere tekst opgenomen die over verschillende risicofactoren in verschillende modellen gaat. Daarboven in het kopje 'Background' staat beschreven welke risicofactoren gepaard gaan met CKD. Gezien het feit dat juist het immuunsysteem, het vaatsysteem en het functioneren van stamcellen belangrijk zijn voor in situ TE, maakt CKD tot een relevante pathologie om te onderzoeken.

- Op pagina 4 tot en met 8 van de Projectaanvraag, 3.4 Onderzoeksstrategie, is een uitgebreidere tekst opgenomen die met grafieken en tabellen de chronologische gebeurtenissen na in situ TE beschrijft. [REDACTED]

Uitleesparameters in Appendix 1 worden besproken op pagina 2, 2.A en L. Uitleesparameters in Appendix 2 worden besproken op pagina 2, 2.A en L. Afstotingsrisico's van het synthetische materiaal worden besproken in de Projectaanvraag op pagina 6, 3.4 Onderzoeksstrategie. Afstotingsrisico's na stemceltransplantatie in Appendix 2 worden besproken op pagina 5 (2.A) en pagina 9-10 (I).

Ontstekingsrisico's in beide Appendici worden besproken onder I en J.

- Op pagina 4 tot en met 8 van de projectaanvraag, 3.4 Onderzoeksstrategie, is een uitgebreidere tekst opgenomen die met grafieken en tabellen de chronologische gebeurtenissen na in situ TE beschrijft. [REDACTED]

[REDACTED] Wel is het eventueel mogelijk dat er geen bloed door de graft zal stromen vanwege de vorming van een thrombus. Deze situatie wordt beschreven in Appendix 1 pagina 9 (I) en pagina 10 (J). Deze situatie wordt beschreven in Appendix 2 pagina 9 (I) en pagina 10-11 (J).

Het ongerief is in overleg met de IvD aangepast en dit wordt beschreven in Appendix 1 pagina 10-11 (K). Deze situatie wordt beschreven in Appendix 2 pagina 11 (K).

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.

- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, dat door de DEC wordt ingeschat als substantieel. Het onderzoek van deze projectaanvraag richt zich op de ontwikkeling van synthetische bloedvaten met behulp van *in situ* tissue engineering (TE) voor therapeutische toepassing bij patiënten met chronisch nierfalen. Chronisch nierfalen is een ernstige ziekte die grote invloed heeft op het dagelijks leven en de levensverwachting van patiënten. In de eindfase van deze aandoening kunnen bloedvaten ten gevolge van arteriosclerose verstopt raken, wat het uitvoeren van een dialyse ernstig kan bemoeilijken. Patiënten zouden erbij gebaat zijn als een aangetast bloedvat vervangen kan worden door een synthetisch bloedvat. Onderzoek naar de mogelijkheden van *in situ* TE voor een dergelijke toepassing leverde veelbelovende resultaten op, maar werd onder gezonde *in vitro* en *in vivo* omstandigheden uitgevoerd – terwijl *in situ* TE in de kliniek juist onder pathologische omstandigheden toegepast zal worden. Aangezien de werking van *in situ* TE berust op de capaciteit van het immuunsysteem om circulerende immuuncellen te mobiliseren en op de betreffende plek weefselregeneratie te initiëren, is het de vraag of onder pathologische omstandigheden dezelfde resultaten behaald kunnen worden als onder gezonde omstandigheden. Met dit project wil de aanvrager daarom onderzoeken of chronisch nierfalen – en daarmee gepaard gaande immunologische en vasculaire risicofactoren en stamcellen disfunctie – invloed heeft op de wondgenezing en weefselvorming na *in situ* TE.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het project is opgedeeld in duidelijke fasen, waarbij in twee diermodellen onderzocht wordt welke invloed chronisch nierfalen heeft op de resultaten van *in situ* TE, zowel in 'naakte' als in 'gebiofunctionaliseerde' scaffolds. In de eerste fase van het project worden *in vivo* experimenten uitgevoerd in gezonde ratten en in ratten met chronisch nierfalen. Tegelijkertijd worden *in vitro* experimenten uitgevoerd met naakte en gebiofunctionaliseerde scaffolds. In de tweede fase van het project worden de *in vivo* experimenten uit de eerste fase herhaald in een gehumaniseerd muizenmodel, zodat onderzocht kan worden wat de rol is van circulerende (humane) immuuncellen tijdens genezing en weefselvorming na *in situ* TE. In de laatste fase van het project wordt de meest veelbelovende gebiofunctionaliseerde scaffold – gekozen op basis van de resultaten uit de eerste twee fasen – onderzocht in het gehumaniseerde muizenmodel, waarbij voorafgaand aan de implantatie bij een deel van de dieren nierfalen wordt geïnduceerd. Dit gehumaniseerde muismodel voor nierfalen helpt onderscheid te maken tussen effecten die toe te schrijven zijn aan nierfalen (*mouse derived*) en effecten die toe te schrijven zijn aan circulerende immuuncellen (*human*

derived). Met deze gefaseerde opzet kunnen resultaten uit de eerste fase van het project gevalideerd worden in een tweede nierziektemodel, wordt translatie naar de mens bevorderd, en kunnen onderliggende mechanismen van *in situ* TE onder omstandigheden van chronisch nierfalen grondig bestudeerd worden. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

5. 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)
 - Gefokt voor dierproeven (11)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Huisvesting en verzorging
 - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor alle dieren in bijlage 1 wordt het ongerief ingeschat als matig. Dit ongerief is het gevolg van twee chirurgische ingrepen (inductie van nierfalen of sham operatie en implantatie van een scaffold) en het geïnduceerde nierfalen. In bijlage 2 wordt het ongerief eveneens voor alle dieren ingeschat als matig. Dit ongerief is het gevolg van sublethale bestraling - al dan niet in combinatie met stamceltransplantatie - en implantatie van een scaffold. Voor alle stappen die de dieren tijdens een experiment doorlopen zijn duidelijke humane eindpunten geformuleerd. Door dieren te euthanaseren wanneer ze een van deze humane eindpunten bereiken wordt voorkomen dat ze meer dan matig ongerief ervaren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De interacties tussen stamcellen uit het beenmerg en het immuun- en vasculaire systeem zijn medebepalend voor de wondgenezing en weefselvorming na *in situ* TE. De interacties zijn dusdanig complex, dat deze niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden, waardoor *in vivo* experimenten noodzakelijk zijn. De voorgestelde dierproeven worden zoveel mogelijk aangevuld met resultaten uit *in vitro* en *ex vivo* experimenten. Met behulp van *in vitro* experimenten wordt de infiltratie van immuuncellen in scaffolds nader onderzocht, waarbij met [REDACTED] – een fysiologische bloedstroom nagebootst wordt. Na afloop van metingen die onder terminale anesthesie worden uitgevoerd worden scaffolds geëxplanteerd, zodat morfologie en infiltratie van immuuncellen nader onderzocht kunnen worden. In verband met de risico's van de ingrepen en de aard van de benodigde gegevens (onder andere morfologisch onderzoek van de scaffold na explantatie) is

het niet mogelijk om het onderzoek in mensen uit te voeren.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Met behulp van gegevens uit eerder uitgevoerde *in vitro* en *in vivo* experimenten worden powerberekeningen uitgevoerd, zodat het optimale aantal dieren per groep vooraf bepaald kan worden. Bij de groepsgroottebepaling wordt rekening gehouden met uitval om technische en modelgerelateerde redenen (voor details verwijst de DEC graag naar punt 9). Om dergelijke uitval – en daarmee onnodig gebruik van proefdieren - zoveel mogelijk te voorkomen worden chirurgische ingrepen uitvoerig geoefend voorafgaand aan de experimenten. Om proefdieren in de experimenten zo efficiënt mogelijk te gebruiken worden bij elk dier verschillende *in vivo* en *ex vivo* metingen verricht. Het project is opgedeeld in duidelijke fasen met go/no-go beslissingen, waarmee onnodig proefdiergebruik voorkomen kan worden. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Binnen de onderzoeksgroep is veel ervaring met het induceren van chronisch nierfalen in het beschreven rattenmodel, daarom zal bij maximaal 5% van de ratten de ingreep om technische redenen niet slagen. 10% van de ratten zal het humane eindpunt bereiken door de gevolgen van het geïnduceerde nierfalen. In het muizenmodel wordt nierfalen geïnduceerd door deoxycorticosteron-acetaat en een zoutrijk dieet te verstrekken. Daarbij wordt geen uitval verwacht om technische redenen of door de gevolgen van het geïnduceerde nierfalen. De sublethale bestraling die de muizen ondergaan heeft 15% uitval tot gevolg. 20% van de muizen die ook een stamceltransplantatie ondergaan zal in verband met een graft-versus-host reactie uit de proef genomen worden. Na inductie van nierfalen worden dieren nauwkeurig gemonitord met behulp van bloed- en urineanalyse en bloeddrukmetingen. Wanneer de gewenste mate van nierfalen bereikt is worden scaffolds geïmplanteerd. Naar verwachting zal 5% van de ratten en 10% van de muizen tijdens deze ingreep om technische redenen uitvallen. Het kan namelijk voorkomen dat geen functionele bloedstroom door de scaffold plaatsvindt, omdat een thrombus het synthetische bloedvat afsluit, ook na adequate therapie met anticoagulantia. Dieren worden tot 7 dagen na implantatie gemonitord met behulp van de cage-lid test, omdat ook na afloop van de ingreep thrombusvorming kan optreden met paralyse tot gevolg. Naar verwachting zal 25% van de ratten met nierfalen, 20% van de gezonde ratten en 5% van de muizen om deze reden uit de proef gehaald worden. Implantatie van gebiofunctionaliseerde scaffolds wordt alleen uitgevoerd, wanneer implantatie van naakte scaffolds in dieren met chronisch nierfalen zonder complicatie is verlopen, en *in vitro* experimenten geen aanwijzingen leverden voor mogelijke negatieve effecten van biofunctionalisatie op wondgenezing en weefselvorming.

Om ongerief zoveel mogelijk te beperken worden adequate – en op de chirurgische ingreep afgestemde – analgesieprotocollen toegepast. Wanneer tijdens de intensieve monitoring na een operatie blijkt dat de dieren onvoldoende herstellen, dan worden ondersteunende maatregelen getroffen (weekvoer, aanvullende analgesie en solitaire huisvesting). Mocht een dier desondanks in conditie verslechteren en een van de geformuleerde humane eindpunten bereiken, dan wordt het geëuthanaseerd.

In het rattenmodel wordt gewerkt met de Sprague-Dawley rat, omdat deze makkelijk hanteerbaar is, vaak gebruikt wordt voor het beschreven chronisch nierfalenmodel, en beter aansluit bij de heterogene populatie humane patiënten dan een inbred stam. Alleen volwassen vrouwelijke ratten worden ingezet, omdat de abdominale aorta door het lagere lichaamsgewicht beter toegankelijk is voor implantatie dan bij mannelijke dieren. Daarnaast hebben volwassen vrouwelijke dieren een stabiel lichaamsgewicht. Dit is van belang, omdat onverwachte groei vlak na implantatie - wanneer de scaffold nog niet bekleed is met cellen/weefsel - lekkage of ruptuur van de scaffold tot gevolg kan hebben. Voor het muizenmodel zal gekozen worden voor een stam die een optimale balans heeft tussen voldoende *engraftment* (vereist een zwak immuunsysteem) en goede wondgenezing en weefselvorming (vereist een sterk immuunsysteem), die een goede overleving heeft na bestraling en die gevoelig is voor inductie van nierfalen.

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

D. Ethische afweging

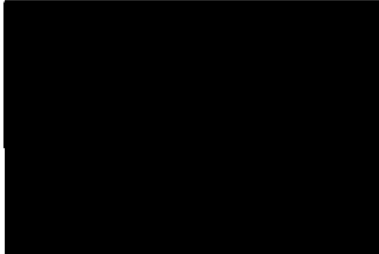
Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling – onderzoeken welke invloed chronisch nierfalen heeft op de wondgenezing en weefselvorming na *in situ* TE – substantieel is. De uitval om technische en modelgerelateerde redenen is aanzienlijk (25% van de gezonde ratten, 45% van de ratten met chronisch nierfalen, 30% van de muizen zonder stamceltransplantatie en 50% van de muizen met stamceltransplantatie), maar de DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat de verschillende diermodellen en experimenten noodzakelijk zijn voor het bereiken van de doelstelling. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren in mensen, en er zijn evenmin volwaardige *in silico* of *in vitro* alternatieven beschikbaar. Waar mogelijk worden *in vitro* en *ex vivo* experimenten uitgevoerd. Er is voldaan aan de vereisten van vermindering en verfijning. Het project is opgesplitst in logisch op elkaar volgende fasen met go/no-go beslissingen, en voor alle stappen die de dieren tijdens een experiment doorlopen zijn heldere humane eindpunten geformuleerd. Op deze wijze kan voorkomen worden dat dieren meer dan matig ongerief ervaren. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

vies is gebaseerd op consensus.





> 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
AVD115002015310

Bijlagen

2

Datum 12 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 9 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015310. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ████████████████████
Functie: ████████████████████
Afdeling: ████████████████████████████████
Telefoonnummer: ████████████████
E-mailadres: ██

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 december 2015
Geplande einddatum: 1 december 2020
Titel project: Influence of non-conventional CV risks due to CKD on aortic vascular graft in situ TE
Titel niet-technische samenvatting: De invloed van nierfalen op weefselconstructie van bloedvaten
Naam DEC: DEC-Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Utrecht
Datum: 5 november 2015



> 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
AVD115002015310

Bijlagen

2

Datum 12 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 12 november 2015

Vervaldatum: 12 december 2015

Factuurnummer: 15700310

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015310	€ 741,00

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

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 2 december 2015 17:10
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Re: aanvullende vraag AVD115002015310

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED],

Dank voor uw bericht over bovenstaande project aanvraag. Ik kan U melden dat de vraag over de aantallen dieren die ingezet worden voor training van onderzoekers en biotechnici zoals vermeld in bijlage 1 aan de orde is geweest in de DEC . In de fase van schrijven van het advies voor de CCD is aan de onderzoeker zelfs nog gevraagd de motivatie aan te scherpen hetgeen gebeurd is. Het is mij inmiddels gebleken dat de onderzoeker ons niet heeft vermeld dat de gevraagde dieren voor training ook worden ingezet in andere projecten waar deze biotechnische ingreep wordt toegepast. In feite wordt project overstijgende service verleend aan andere onderzoekers van de afdeling vanuit dit project . Het hoge aantal dieren wordt daarmee verklaarbaar. De tekst moet uiteraard worden aangepast en de onderzoeker is daarvan inmiddels op de hoogte.

Uw tweede vraag over het benodigd aantal dieren voor een pilot bedoeld om de stralingsdosis vast te stellen moet uiteraard ook worden beantwoord door de onderzoeker en ook dat zal moeten leiden tot aanpassing van de tekst.

Ik hoop van harte dat ik hiermee uw vragen voldoende beantwoord heb . Zo niet dan ben ik gaarne bereid nadere informatie te verstrekken . Ik neem aan dat U zelf de onderzoeker benadert met uw terechte vragen .

Met vriendelijke groet,

<image001.png>

Secretaris DEC | Raad van Bestuur, Dierexperimentencommissie

Universitair Medisch Centrum Utrecht | Kamernummer C01.106 | Huispostnummer D01.343 |
Postbus 85500 | 3508 GA UTRECHT

T: +31 88 75 592 47 | www.umcutrecht.nl | Werkdagen: maandag t/m vrijdag

De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zjn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 1 december 2015 17:38
Aan: dec-utrecht
CC: 'Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht'
Onderwerp: aanvullende vraag AVD115002015310

Geachte leden van DEC Utrecht,

Bij de CCD is een aanvraag voor projectvergunning aangeboden onder nummer AVD115002015310 getiteld: "Influence of metabolic risks on aortic vascular graft in situ tissue engineering". Uw DEC heeft hierover advies uitgebracht aan de CCD.

Er zijn nog een aantal onduidelijkheden in de aanvraag die wij aan de onderzoeker willen voorleggen, maar eerst zouden we graag van u horen of deze zaken in het adviseringstraject aan de orde zijn geweest.

In bijlage dierproeven 3.4.4.1 wordt beschreven dat de technieken die nodig zijn voor de uitvoer van het experiment eerst worden geoefend. De onderzoeker onderbouwd hoeveel dieren hiervoor nodig zijn om 6 personen op te leiden. Dit zijn n=150 dieren op jaarbasis. De onderzoeker voert in totaal n=750 dieren op voor de gehele project duur wat suggereert dat er jaarlijks 6 mensen moeten worden opgeleid. Hoe heeft u dit meegewogen? Het totaal aantal dieren voor het oefenen is nu de helft van het aantal dieren welke voor het hele project ingezet worden.

In bijlage 3.4.4.2 Wordt een pilot study beschreven om de hoogte van de dosis voor het bestralen van de muizen vast te stellen. Hiervoor worden geen dieren in aantal beschreven. Wij zouden de onderzoeker willen vragen het mogelijke aantal pilotstudies en het aantal muizen op te nemen in de bijlage dierproeven,

Met vriendelijke groet, XXXXXXXXXX

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....

T: 0900 2800028

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

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 15 december 2015 9:50
Aan: 'Info-zbo'; [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag aanvullende informatie AVD115002015310
Bijlagen: [REDACTED]

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Hartelijk dank voor uw snelle reactie en de positieve intentie om de projectaanvraag te vergunnen. Op basis van uw argumenten heb ik de Appendix 1 en de NTS aangepast naar 150 trainingsdieren, zie bijlagen. In overleg met de afdeling zullen wij op een later moment een aanvraag voorbereiden die zich richt op meer algemene training en onderwijs. Graag zie ik nog een bevestiging tegemoet dat u deze documenten in goede orde heeft ontvangen.

In de veronderstelling u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd,
Met vriendelijke groet,



[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] www.umcutrecht.nl

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: maandag 14 december 2015 14:47
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag aanvullende informatie AVD115002015310

[REDACTED]

De CCD heeft uw aanvraag AVD115002015310 getiteld: 'Influence of nonconventional CV risks due to CDK on aortic vascular graft in situ TE' beoordeeld in de vergadering van afgelopen week. De CCD heeft besloten uw aanvraag (gedeeltelijk) te vergunnen maar ziet uw aanvraag in 2 delen uiteen vallen, namelijk de voorliggende projectaanvraag, inclusief een representatief aantal dieren nodig voor training. Daarnaast valt een aanzienlijk aantal van de dieren onder een meer algemene projectaanvraag voor onderwijsdoeleinden.

Voor het besluit en de vergunning van het project 'Influence of nonconventional CV risks due to CDK on aortic vascular graft in situ TE' aan u verzonden kan worden willen wij u vragen om, naast het aantal dieren benodigd voor het project, aan te geven hoeveel dieren u nodig denkt te hebben voor het aanleren van de chirurgische technieken ten behoeve van dit project. De CCD doet de schatting dat dit ongeveer 150 ratten zijn omdat zoals u aangeeft dan 6 mensen binnen uw afdeling de techniek

beheersen. Wij willen u ook vragen de bijlagen dierproeven en de Niet Technische Samenvatting overeenkomstig aan te passen.

De overige 600 ratten die u aanvraagt om studenten en medewerkers van uw afdeling op te leiden ziet de CCD als een meer algemene onderwijsaanvraag waar een aparte ethische afweging over gemaakt hoort te worden,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

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

Van: [REDACTED]

Verzonden: zaterdag 5 december 2015 13:09

Aan: Info-zbo; [REDACTED]

Onderwerp: Re: vraag aanvullende informatie AVD115002015310

Geachte [REDACTED]

Hartelijk dank voor uw mail en de mogelijkheid om aanpassingen te maken aan de hand van de door u tegengekomen onduidelijkheden. Tevens mijn excuses dat de aanvraag niet volledig genoeg was om te kunnen beoordelen

Graag geef ik hieronder puntsgewijs antwoord op de vragen die u gesteld heeft. Voor de volledigheid heb ik ook de documenten aangepast. Per vraag zal ik voor u verwijzen naar waar de aanpassingen gemaakt zijn. Indien dit nog niet aan de orde was, heb ik de aangepaste tekst benadrukt met een gele omlijning.

Wij willen u vragen:

- Bijlage 3.4.4.1 aan te passen zodat uit de beschrijving helder wordt dat het oefenen van de techniek ook aan andere projecten ten goede komt en motiveren dat er 6 medewerkers per jaar worden opgeleid.

Ik begrijp uw punt over het hoge aantal dieren wat gebruikt zal worden voor training ten opzichte van het aantal dieren wat in studie genomen wordt. In de bijlage 3.4.4.1 heb ik nu een duidelijk onderscheid geprobeerd te maken wat het uiteindelijke doel is van de training. Samengevat zijn de technieken die beschreven worden in de Appendix (5/6th nephrectomy, terminal experiment), (micro-)chirurgische ingrepen die in praktisch alle dier-gerelateerde proeven bij ons departement aan de orde komen. De aorta anastomose is een relatief nieuwe techniek maar heeft veel potentie voor toekomstig onderzoek. Het is daarom van groot belang dat alle medewerkers in dienst (PhD studenten en technicians) in staat zijn deze ingrepen uit te voeren. Zo kunnen alle onderzoekers direct van elkaar leren, elkaar bijstaan indien nodig en gaan belangrijke technieken niet verloren. Ik verwacht dat er gemiddeld jaarlijks 2 nieuwe mensen in dienst komen die deze technieken moeten leren. De training dient daarmee een afdelingsbreed doel. In de NTS heb ik dit aangevuld, het goed beheersen van technieken valt volgens ons onder verfijning.

Daarnaast begeleidt ons laboratorium regelmatig studenten, zowel universitair (art.9) als HBO (art.12). Universitair studenten krijgen bij ons de kans een begin te maken met het aanleren van eenvoudige en complexe handelingen gerelateerd aan onderzoek op dieren. HBO studenten krijgen bij ons daarnaast de kans een afstudeerproject te doen en met het verfijnen van hun skills een complexe techniek meester te worden. Op basis van aanmeldingen in het verleden, verwacht

*ik dat er jaarlijks 4 studenten zullen worden opgeleid. Aangezien de aorta anastomose de meest complexe ingreep is, hebben wij besloten om deze training pas aan te bieden wanneer de persoon in kwestie een micro-chirurgische cursus heeft afgerond. Om dieren te besparen, hebben we daarnaast besloten om de anastomose te combineren met de 5/6th nephrectomy, aangezien beide ingrepen (op OK) op 1 dier kunnen worden uitgevoerd. Hopelijk heb ik uw vraag hiermee voldoende beantwoord. **Appendix 1, pagina 4***

- Toe te lichten of u inderdaad pilotstudies nodig heeft om de dosis voor de bestraling te bepalen. En wanneer dit het geval is of u bijlage 3.4.4.2 wilt aanpassen en de beschrijving hiervan en het aantal benodigde dieren opnemen.

Mijn excuses dat er in de appendix geen duidelijk protocol is opgenomen voor het bepalen van de stralingsdosis. Vanwege het feit dat er nog geen muismodel is gekozen, is het verder uitwerken van een dergelijke opzet niet voldoende uitgediept en is helaas niet in de Appendix terechtgekomen. Dit is nu alsnog aangepast in bijlage 3.4.4.2. De uiteindelijke dosissen zullen bepaald worden na de beslissing welk muismodel het meeste geschikt is voor de experimentele opzet. Er is nu een pilot study toegevoegd waarin 3 verschillende dosissen (laag, gemiddeld en hoog) zullen worden getest in de gekozen muis. Om de gevolgen van de straling goed te kunnen monitoren en hier adequaat op te kunnen reageren, zullen wij beginnen met het toedienen van de laagste dosis. Daarnaast zullen de experimenten worden uitgevoerd in overleg met experts op het gebied van humane muizen. Na de irradiatie zal een deel van de muizen humane stamcellen (CD34+) krijgen toegediend en een aantal niet (CD34-). Zo kan de overleving van muizen zonder functioneel immuunsysteem worden bekeken en tegelijkertijd worden bepaald in hoeverre de humane stamcellen integreren in de muis. Er zal in dit stadium 1 dosis CD34+ cellen worden gegeven, deze dosis zal worden bepaald aan de hand van de gekozen muis, literatuuronderzoek en overleg met experts. Om onze experimentele set-up zoveel mogelijk te benaderen, zullen alle muizen ook een aorta-graft ontvangen. Hier komen wij totaal uit op 6 experimentele groepen, met $n = 10$ per groep.

*Wanneer er geen verschillen zouden optreden in overleving en celintegratie tussen de verschillen stralingsdosissen, zal altijd gekozen worden voor de laagst mogelijke dosis. In een tweede pilot studie zal vervolgens de stamcel dosis worden bepaald. Niet alleen het aantal cellen maar ook het totale injectievolume kan namelijk van belang zijn. In deze tweede studie zal tevens gekozen worden tussen 3 verschillende dosissen; een gemiddelde dosis zoals die is toegediend in de eerste studie, een hogere dosis en een lagere dosis. De uiteindelijke dosissen zullen wederom bepaald worden aan de hand van de gekozen muis, literatuuronderzoek en overleg met experts. Voor deze proef zullen dus alleen CD34+ groepen worden gebruikt. Om onze experimentele set-up zoveel mogelijk te benaderen, zullen alle muizen ook een aorta-graft ontvangen. Hier komen wij totaal uit op 3 experimentele groepen, met $n = 10$ per groep. In 3.4.4.2 komen wij dus samenvattend uit op een toevoeging van $n = 90$ dieren, verspreid over 2 pilot studies die zullen moeten bepalen wat de optimale stralingsdosis is (meer engraftment van humane cellen versus betere uitkomst na implantatie) en de optimale celdosis om toe te dienen. Voor deze pilot studies zijn opnieuw 'go/no-go' momenten vastgesteld. Mocht de overleving van de dieren, zowel CD34+ als CD34-, na implantatie lager uitvallen dan 50%, dan zal niet gestart worden met stap b. **Appendix 2, pagina 6 en pagina 7***

- De NTS aan te passen wanneer u meer dieren nodig heeft in bijlage 3.4.4.2

*Zoals vermeld bij de uitleg op uw tweede vraag, heb ik de NTS aangepast op het aantal dieren. Hopelijk heb ik uw vraag hiermee voldoende beantwoord. **NTS pagina 2***

- De NTS aan te passen voor wat betreft het aantal ratten, wilt u die uitsplitsen naar nodig voor technieken aanleren en nodig voor project. U kunt overwegen in de NTS het onderdeel voor het oefenen van de techniek nader toe te lichten.

Zoals vermeld bij de uitleg op uw eerste vraag, heb ik de NTS aangepast op 1)uitsplitsen van dieraantallen 2)ongerief 3)toelichting voor training onder verfijning. Hopelijk heb ik uw vraag hiermee voldoende beantwoord. NTS pagina 2, pagina 3, pagina 5

In de bijlagen vindt u de aangepaste versies van Appendix 1, Appendix 2 en de NTS. Hopelijk heb ik hiermee al de onduidelijkheden naar tevredenheid kunnen toelichten.

Mocht u nog aanvullende vragen hebben, dan kunt u mij altijd via dit e-mail adres of telefonisch [REDACTED] benaderen.

Met vriendelijke groet,



On 4 dec. 2015, at 2:30 p.m., Info-zbo <info@zbo-ccd.nl> wrote:

Geachte [REDACTED]

In uw aanvraag AVD115002015310 getiteld: Influence of nonconventional CV risks duet o CDK on aortic vascular graft in situ TE, zitten voor ons nog een aantal onduidelijkheden.

- Het relatief grote aantal dieren die worden opgevoerd in bijlage 3.4.4.1 om de operatietechnieken aan te leren
- In bijlage 3.4.4.2 noemt u een mogelijke pilotstudie om de dosis voor bestraling vast te stellen , maar dit is in de beschrijving niet verder uitgewerkt, en hier zijn ook geen dieren voor opgenomen in de bijlage.

Wij hebben ook aan de DEC die advies heeft uitgebracht over uw aanvraag deze vragen voorgelegd. De voorzitter van de DEC heeft aangegeven dat er contact met u is geweest en dat u heeft toegelicht het oefenen van De operatie techniek ook ten goede komt aan andere projecten.

Wij willen u vragen:

- Bijlage 3.4.4.1 aan te passen zodat uit de beschrijving helder wordt dat het oefenen van de techniek ook aan andere projecten ten goede komt en motiveren dat er 6 medewerkers per jaar worden opgeleid.
- Toe te lichten of u inderdaad pilotstudies nodig heeft om de dosis voor de bestraling te bepalen. En wanneer dit het geval is of u bijlage 3.4.4.2 wilt aanpassen en de beschrijving hiervan en het aantal benodigde dieren opnemen.
- De NTS aan te passen wanneer u meer dieren nodig heeft in bijlage 3.4.4.2
- De NTS aan te passen voor wat betreft het aantal ratten, wilt u die uitsplitsen naar nodig voor technieken aanleren en nodig voor project. U kunt overwegen in de NTS het onderdeel voor het oefenen van de techniek nader toe te lichten.

De CCD zal uw aanvraag komende week in de vergadering behandelen. Om bij de behandeling over alle informatie te kunnen beschikken wil ik u vragen om uiterlijk aanstaande dinsdag de antwoorden toe te sturen aan de CCD. Het is daarvoor voldoende als u op deze mail reageert. De aangepaste documenten kunt u dan op een later tijdstip toesturen,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

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

De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.

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.



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Influence of CKD on TE aortic vascular scaffolds in the rat</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Influence of CKD on TE aortic vascular scaffolds in the rat
Volgnummer	Type dierproef					
1	Influence of CKD on TE aortic vascular scaffolds in the rat					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

With these experiments, we want to study the influence of CKD versus healthy rats on tissue formation and wound healing after *in situ* TE (see outline 3.4.2).

Step a: By comparing rats with chronic kidney disease (CKD) to healthy controls, we will be able to investigate the influence of the pathology

CKD on tissue formation and wound healing after *in situ* TE.

Step b: By adding bio-functionalization to the scaffold in CKD rats versus healthy controls, we will be able to determine whether or not bio-functionalization can improve tissue formation and wound healing after *in situ* TE. Moreover, we will be able to determine whether bio-functionalization affects tissue formation and wound healing in CKD using the same mechanisms as in healthy controls.

Step c: In this decision-making step, we will compare the *in vitro* results with results from **Step a/b** to choose the most promising bio-functionalization target, which can then be used in Appendix 2 **Step e**, in an immunocompromised mouse with renal disease. This will allow us to validate the workflow and double check the importance of a promising bio-functionalization candidate in a second kidney disease model in a humanized immune environment.

To accomplish our goals, we will use adult female rats in which CKD is induced using a single surgical intervention. To assure a comparable degree of CKD, a threshold has to be reached before a scaffold shall be implanted.

By studying effects of CKD, we will be able to determine whether the alterations in function of (circulating) stem cell and the vascular and immune system in CKD will affect the process of *in situ* TE.

In this study, important ex vivo outcome variables will be measured by immunohistochemistry, qPCR and Western blot and include the effect of CKD on the presence of specific cell types in the scaffold, [REDACTED]

[REDACTED]. With bio-functionalization we will investigate the presence of cells and cell types in healthy versus CKD animals, also compared to bare grafts.

Non-invasive longitudinal measurements include drawing blood and taking urine (assessing renal function) and determining blood pressure.

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

In these experiments we want to compare CKD versus healthy animals on outcome after *in situ* TE, [REDACTED]
In **Step a/b**, a surgical model of CKD, namely 5/6th nephrectomy (SNX), will be studied in comparison to weight-matched sham-operated controls. Both in our laboratory and world-wide, the SNX model is a well-studied, reproducible model to induce CKD in laboratory rats (van Koppen et al., 2012; Cell Transplant, van Koppen et al., 2013; JOVE, Ryan et al., 2014; Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.).

Combining **Steps a/b** realizes 4 main experimental groups:

Sham + scaffold

CKD + scaffold

Sham + bio-functionalized scaffold

CKD + bio-functionalized scaffold

As a comparison for functional measurements, we will also include a small amount of non-implanted animals (e.g. n=3) [REDACTED]

To validate renal injury and reduce experimental variation, a threshold of 15 mMol/L of blood urea for established CKD has to be reached before the implantation of the experimental scaffold. 5/6th nephrectomy will be performed in a single surgical intervention. This will speed up the injury progression (unpublished observation) and limit the total amount of interventions needed for this protocol. After 5/6th nephrectomy, blood will be drawn via the tail vein every week, requiring only light inhalant anaesthesia. Blood pressure will be assessed weekly using non-invasive tail-cuff measurement, for which animals will be trained, in order to reduce stress. We have a lot of experience in reliably obtaining results from animals using this tail-cuff method. An average of 11 weeks of CKD should lead to a blood urea concentration around 15 mMol/L (van Koppen et al., 2012; Cell Transplant). In practice, when 5/6th nephrectomy is performed at 8 weeks of age, the threshold for urea is reached at an age of 19 weeks. Once the threshold of 15 mMol/L blood urea has been reached for two consecutive weeks, vascular scaffold implantation will take place in the week after the last measurement. Female rats are expected to reach 300g of body weight after 4 months of age, on the flat part of the growth curve (website Harlan), and thus females of +/- 20 weeks will have reached this body weight upon implantation. This is important because the graft cannot grow, at least not as long as it composed of non-cellular or non-cell-derived tissue. Tail cuff pressure and blood urea will also be measured at multiple time points after scaffold implantation (e.g. once a week).

[REDACTED] All *in vivo* measurements will be followed by *ex vivo* studies on isolated tissues.

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

To avoid experimental variation, all 4 main experimental groups

Sham + scaffold

CKD + scaffold

Sham + bio-functionalized scaffold

CKD + bio-functionalized scaffold

will be studied longitudinally in balanced cohorts.

In our current project, the major readout-parameter (CKD) is robust enough not to be influenced by a variety in genetic background. The variety in genetic background in patients with CKD is moreover an advantage of using this model, increasing its translational validity. While both sexes are suitable to undergo surgery, we choose to select females only. First of all, in this study we would like to select animals based on weight, rather than on age. This selection is based on the fact that we only want to implant the abdominal aorta scaffold after the (vascular) growth spurt of the animals, to prevent leakage or rupture of the scaffold. We predict that during the early phase after implantation, no growth and adaptation of the scaffold will take place due to lack of cells infiltrating the scaffold. Therefore, implantation can

only take place within the stable growth curve of the animal. Since females are generally lighter and show less rapid changes in body weight (website Harlan), female animals weighing more than 300g are preferred in this setting. Moreover, due to a lower body weight compared to males, the surgical implantation of the scaffold will be easier due to better accessibility of the aorta. The increased technical feasibility will thus decrease mortality due to technical failure.

CKD may influence the patency after aorta implantation due to changes both in blood flow and changes in thrombogenicity. While proteinuria may lead to increased thrombogenicity, CKD without excessive proteinuria may lead to bleeding tendencies. We therefore estimate that 35% of the animals with CKD will have to be killed before or after implantation but before the end of the experiment. We expect a total survival rate around 55% (maximum 5% technical failure SNX + 5% technical failure scaffold implantation + 10% CKD-related HEP +25% non-functional blood flow through scaffold, **see also Humane End Points**). For sham animals we expect a maximum 5% technical failure scaffold implantation +20% non-functional blood flow through scaffold, **see also Humane End Points**.

Summarizing:

Survival sham = 75%

Survival CKD = 55%

To minimize mortality in the sense of technical failure, training will be necessary to master the 5/6th nephrectomy and the scaffold implantation procedures. We believe that, at all times, 1 technician and 1 PhD student should have mastered both skills, since especially the abdominal aorta implantation is much more feasible when two persons work together simultaneously (own observations). Collecting data from a terminal experiment (renal clearance via PAH and Inulin measurements) also requires extensive practice. The 5/6th nephrectomy and the renal terminal experiment are moreover surgical hallmarks of our laboratory and have been steadily used in almost all experimental settings in the past, either combined or individually.

Therefore, we believe it is of importance that researchers and technicians working on the current project get the chance to receive training in surgical techniques. This will benefit all those involved, since employees may help each other improve and pass on valuable skills. University (art.9) and HBO (art.12) students directly involved in this project may also need to practice these skills, as previously discussed in our current training protocol DEC 2011.II.03.056. Based on these previous calculations and experience in how long training will take on average, we predict that we will need N=150 animals (N= 25 per person (1 PhD, 1 technician, 2 art.9 and 2 art.12, 6 x 25 = 150) with N=10 for SNX and/or abdominal aorta end-to-end anastomosis since both procedures can be performed in a single animal in an operating room and N=15 for a terminal experiment) for training and education.

Training of end-to-end anastomosis will only commence after the researcher in question has completed a microsurgery course (e.g. UMC Groningen, René Remie in Almere or elsewhere). Since this may not always be the case, one animal will either be used to learn the 5/6th nephrectomy or the 5/6th nephrectomy in combination with the aorta anastomosis. This will limit the total amount of animal needed. If possible and available, surplus animals are used for training purposes.

The rationale for performing this study *in vivo* is fully based on previous *in vivo* and *in vitro* studies. By taking these results into account, we are able to make an accurate power calculation, thereby reducing the number of animals required. Moreover, a previous study has already shown that bio-functionalized scaffolds *in vitro* are able to increase initial monocyte recruitment in a dynamic setting (Smits et al., 2014; Cel.. Mol. Med.)

██████████ On the other hand, multiple studies have shown that the regenerative potential of stem cells in CKD both *in vivo* and *in vitro* is less than in the healthy situation (van Koppen et al., 2012; Cell Transplant, Drewa et al., 2008; Transplant. Proc.).

To show how we have calculated the amount of animals necessary for our experiments, an example showing an experiment with 5 experimental groups representative of **Step b** is given.

In this example, we will only compare CKD rats.

- 1) CKD + bare scaffold
- 2) CKD + ██████████ scaffold
- 3) CKD + ██████████ scaffold
- 4) CKD + ██████████ scaffold
- 5) CKD + unidentified target scaffold

In a previous study we found that changing the biomaterial leads ██████████. Since bio-functionalization experiments have previously not been performed, the change of biomaterial in this setting is taken as an approximation for this phenomenon.

In this study, the effect size was 2,21, with n=12 per group (calculated power = 0.99). As an example of primary readout, the amount of ██████████ is also used.

With an effect size = 2.21, Power = 0.8 and alpha = 0.05 corrected for 5 experimental groups, we calculated the amount of animals necessary using F-test for ANOVA: fixed effects, omnibus, one-way. **The outcome was n = 10**, specific for the readout parameter ██████████. We believe that this is also the minimum amount of animals needed to see differences in readout-parameters in our study, since variation in cellular response due to differences in genetic background may be present in our SD-model.

B. De dieren

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

To minimize the variation in our readout-parameters and to approximate the adult heterogenic patient population with CKD, the female outbred SD model based on weight is preferred. The Sprague-Dawley (SD) rat is an outbred model and Hsd:Sprague Dawley®™ (SD®™) rats are bred by Harlan in the Netherlands. Adult females only will be used. The SD rat is very easy to handle, is suitable for surgical intervention and is commonly used for 5/6th nephrectomy. When typing 'CKD' combined with a specific rat model on PubMed, hits are as follows: Lewis n=13, Wistar n=90, Sprague Dawley n=205, supporting the validity of the model.

Total N=150 animals for training and education. If possible and available, surplus animals are used for training purposes.

For **Step a**, based on a terminal group size of N=10-20 and two experimental groups (sham vs CKD),
Total N= 31 – 63 rats.

For **Step b**, we will choose the three currently known targets for bio-functionalization: [REDACTED] [REDACTED] and 1 unknown candidate (or combination of known candidates) that emerges from the *in vitro* and *in vivo* data obtained in **Step a**.

Based on a terminal N= 10 – 20 per group, and 10 experimental groups

Total N= 134 – 267 for healthy rats

Total N= 181 – 364 for CKD rats

Therefore, in total for the studies described in Appendix 1 we estimate that **we will need a maximum of 844 rats.**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

The rationale for performing this study *in vivo* will be fully based on previous *in vivo* and *in vitro* studies. Besides using blood from healthy volunteers, *in vitro* experiments may be complemented by the use of patient material (e.g. blood of CKD patients). However, *in vitro* studies alone will not suffice to act as pre-conditional input for the *in vivo* studies. *In vitro* data will not give us sufficient insight into the process of tissue formation and wound healing, due to factors such as signalling from and to the bone marrow. Thorough searches of the literature have confirmed that experiments performing *in situ* TE in diseased rodents have not been previously conducted.

To gain as much information as possible from a single animal, we will perform different types of measurements. [REDACTED]

[REDACTED] Moreover, other relevant tissues will be collected to assess morphology and cellular infiltrate. As for refinement, all surgeries will be performed by experienced surgeons. Animals will be group-housed and given cage enrichment. Moreover, a pain relief protocol after 5/6th nephrectomy has already been established with the help and approval of UU -associated veterinarians. A new optimized protocol for pain relief after implantation of the abdominal scaffold will also be included with the help of veterinarians. An optimized protocol to provide anti-thrombogenic therapy in animals lacking patent blood flow after the

implantation surgery is currently in preparation together with experienced nephrologists.

As stated in **Step a**, CKD animals will first undergo surgery to implant 'bare' scaffolds. If the disease model is not compatible with the implantation of an abdominal scaffold (e.g. survival < 50%), this is considered a 'no go' moment and in close consultation with the IVD, decisions will be made concerning **Step b** and Appendix 2.

To validate renal injury and further reduce experimental variation, a threshold of 15 mMol/L of blood urea for established CKD has been chosen before the implantation of the experimental scaffold. Due to experience and skilled personnel, CKD can be reliably and repetitively be induced. Moreover, minimizing variability will also be accomplished by using female animals only and selecting based on weight, assuring that vascular growth will not compromise the experiment. Based on previous experiments, we are able to persistently induce CKD in the rat using the 5/6th nephrectomy model (van Koppen et al., 2013; JOVE), thus minimizing mortality due to technical failure (< 5%).

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

Previously approved DEC's using the 5/6th nephrectomy model at our department have already made use of an optimized protocol for pain-relief, which will be applied for up to 48 hours after surgery. This protocol has previously been established with the help and approval of UU - associated veterinarians. A new optimized protocol for pain relief after implantation of the abdominal scaffold will also be included with the help of veterinarians. An optimized protocol to provide anti-thrombogenic therapy in animals lacking patent blood flow after the implantation surgery is currently in preparation together with experienced nephrologists. Moreover, extensive training is given to optimize the complex surgical procedures before the start of the experiment.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

After surgical intervention to induce CKD, animals may lose weight and develop inflammation or fever. During the follow-up period before animals have reached the urea threshold, general health may decline.

After implantation of the scaffold, both the site of implantation and the intestines may get infected. The inflammatory response against the synthetic scaffold is an integral part of the *in situ* TE approach. We do not expect side-effects as a consequence of the placement of a synthetic vessel.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

CKD will be induced in a single surgery. Through incisions in the flanks, one kidney will be removed as a whole while the poles of the second kidney will be cut. During recovery, rats may develop inflammation of the incision sites and/or fever. During follow up general health may decline due to build-up of toxins in the blood, normally cleared by the kidney.

During the implantation surgery, the intestines have to be removed from the abdominal cavity to allow access to the aorta. This may lead to intestinal infections post-surgery. The incision length over the linea alba stretches from just below the diaphragm until the genital area and may also get infected after closure.

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

All surgeries will be performed by experienced staff (2 persons simultaneously), to decrease overall surgery time and specifically the

ischemia-time. After implantation of the scaffold, patency of the scaffold will be assessed while the animals are still under anesthesia. When patency cannot be assured due to the presence of a thrombus, anti-thrombolytic therapy (e.g. Plavix) can be administered. Animals that show patency of the graft will still be checked the first 7 days for hind-limb ischemia (see J, humane eindpunten). Moreover, all animals will be monitored closely after implantation surgery for changes in general clinical characteristics. Animals will be checked for motility and cleaning behavior. Weight and temperature will also be monitored. Possible interventions in animals with altered clinical characteristics include individual housing, altered diet (water-based powder chow) and an increased or prolonged amount of analgesia. In close consultation with the IvD, animals that show no improvement in health will be excluded and killed.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Our first HEP (1) will consist of assessing general characteristics during follow-up of CKD but before scaffold implantation. Animals will be checked for motility and cleaning behavior, weight, temperature and raised fur. Our second HEP (2) will consist of assessing the patency of the aortic scaffold directly after implantation but while the animal is still under anaesthesia. In the patency of the graft does not improve after anti-thrombogenic therapy and when the hind limbs of the animals appear to remain ischemic (cold, pale), the animal will be excluded and killed. Our third humane-endpoint (3) will consist of assessing limb-function at Day 1,2,3,5 and 7 after implantation surgery using the cage-lid test. If one of the limbs fails this test, the animal will also be excluded and killed. The fourth HEP (4) will consist of monitoring weight loss, infection and general health after implantation, with the same exclusion criteria as HEP (1).

Moreover, when general clinical characteristics change and we expect the discomfort to shift from 'matig ongerief' to 'ernstig ongerief', such as an acute drop in weight (15% or more in 2 days), a humane endpoint is also reached. We will thus humanely kill all animals within 'matig ongerief' expected to deteriorate in health in such a way that 'ernstig ongerief' will be reached.

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

The study is designed to restrict discomfort as much as possible and apply HEPs when necessary. During this experiment, we expect only a low mortality of animals. Both technical failure of 5/6th nephrectomy (SNX) and technical failure of scaffold implantation are thought to occur in less than 5% of the animals (own observations) when performed by skilled micro surgeons. However, we do expect it is necessary for a part of the animals to be killed before the end of the experiment, both to prevent increased discomfort ('ernstig ongerief') and mortality. So there is a clear distinction between interim model-related mortality (which we prevent as much as possible by assessing humane-end points), technical failure (which will be low) and reaching a humane-end point (HEP, which will be assessed).

Our first HEP (1) will consist of monitoring general health after induction of CKD but before implantation of a vascular scaffold.

Our second HEP (2) will consist of assessing the patency of the scaffold after implantation. For the implantation of the vascular scaffold, it is

necessary to temporarily clamp the aorta to prevent bleeding. In some cases, this ischemia and subsequent reperfusion can lead to irreversible damage in downstream tissues of the abdominal aorta. A clear example of this damage is paralysis of the hind legs. If the scaffold fails to be patent, for instance due to thrombus formation and anti-thrombogenic therapy does not improve the patency, the animal will be excluded and killed. A previous study on healthy SD rats showed patency of 85% 4-8 weeks after implantation of an abdominal aorta scaffold [34]. We estimate 15% of this 20% sham (or 20% of 25% CKD) will be excluded during surgery after anti-thrombogenic therapy and 5% after a positive cage-lid test. The 5% will be tested at several time points after the implantation surgery and excluded whenever the cage-lid test is positive for one or more limbs. To prevent this mortality and increased discomfort due to ischemia in downstream targets of the aorta, we choose to implement the cage-lid test and actively prevent mortality, taking animals out of the study that are at risk of increased discomfort.

Our third humane-endpoint (3) will consist of assessing limb-function at Day 1,2,3,5 and 7 after implantation surgery using the cage-lid test. If one of the limbs fails this test, the animal will also be excluded and killed. The fourth HEP (4) will consist of monitoring weight loss, infection and general health after scaffold implantation.

The most common signs of increased discomfort in the current study will be:

- 1) Paralysis of the hind limbs, visible in the first days after the implantation of the vascular scaffold
- 2) Persistent infection of the abdominal region after placement of the vascular scaffold
- 3) Paralysis of other limbs and necrosis of tissue due to occlusion of the vascular scaffold

All these signs will serve as exclusion criteria and the animals will subsequently be killed to prevent increased discomfort and mortality.

CKD may influence the patency after aorta implantation and may influence the healing process. We therefore estimate that an additional 20% of the animals with CKD will have to be killed before the end of the experiment. This would mean that we estimate 45% of CKD animals will be killed before the end of the study, while 25% of the sham animals will be killed before the end of the study.

K. Classificatie van ongerief

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

This experiment is determined as 'matig ongerief'. All animals will undergo two surgical events (induction of kidney disease or sham and scaffold implantation) plus follow-up. Reaching the urea threshold of renal disease is expected to vary between animals, with an average of 11 weeks. Side effects of developing CKD may include weight loss and overall decreased wellbeing (raised fur). Animals that will be excluded and killed during the implantation will either experience 'matig ongerief' (CKD) or 'licht ongerief' (sham) due to preceding sham or surgical event. Animals excluded during surgery (estimated 15% sham en 20% CKD) will not experience extra discomfort since they will be killed under anesthesia. The remaining 5% will be tested at several time points after the implantation surgery and excluded whenever signs of paralysis emerge. Since the first 48h after surgery, analgesia will be given and 2 cage-lid test are performed during this time-frame, we estimate the discomfort of these animals 'matig ongerief' (both sham and CKD).

As described, we want the animals in this experiment to have a maximum of 'matig ongerief', due to the nature of the interventions and the

duration of the experiments. All animals with deteriorating health will be humanely killed before reaching 'ernstig ongerief'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Animals will be killed approximately [REDACTED] after implantation and extensive work will be conducted on morphology of the scaffold using immunohistochemistry [REDACTED] and specific (Western Blot (WB) and quantitative expression (qPCR)). Other relevant tissues (e.g. heart, bone marrow, kidney and aorta remnant will also be collected to assess weight, morphology and cellular infiltrate. Longitudinal, terminal and post-mortem measurements will allow correlation between morphology of the scaffold and expression profiles in CKD versus control animals with and without bio-functionalization.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Infiltration and early tissue formation of tissue-engineered aortic vascular scaffolds in a humanized mouse model with renal disease</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	2	Infiltration and early tissue formation of tissue-engineered aortic vascular scaffolds in a humanized mouse model with renal disease
Volgnummer	Type dierproef				
2	Infiltration and early tissue formation of tissue-engineered aortic vascular scaffolds in a humanized mouse model with renal disease				

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

With these experiments, we want to study the influence of human-derived stem cells in an immunocompromised mouse on tissue formation and wound healing after *in situ* TE (see outline 3.4.2).

Step a: In this decision-making step, we will determine which mouse is best suitable for the current project. We will have to

choose between higher engraftment of human cells and a more favorable outcome after scaffold implantation. In this context, the sex of the animal seems irrelevant and both sexes will be able to be used to reduce the amount of animals. Moreover, the mouse should be susceptible to developing renal disease. This choice will be made in consultation with experts in the field.

Step b: By transplanting human stem cells into the chosen mouse without a functional immune system (immunocompromised), we will be able to quantify the origin of the cells found in the scaffold. In theory, all human cells found in the scaffold will originate from circulation-derived immune cells and all murine-derived cells originate from tissue-resident cells in the proximity. Using immunohistochemistry, we will compare total cellular content in the scaffold of immunocompromised mice with and without stem cell transplantation to quantify the contribution of circulation-derived cells in in situ TE. We will also be able to double-stain human markers and murine markers

blood pressure using non-invasive tail-cuff measurement will be performed longitudinally.

Step c: By adding bio-functionalization to the scaffold, we will be able to determine whether or not the origin of attracted cells found in the scaffold differs compared to bare scaffolds, using the same techniques as in **Step b**. Moreover, we will be able to determine whether bio-functionalization positively affects tissue formation and wound healing in this mouse.

Step e: By studying the humanized mouse with and without renal disease, we can distinguish the influence of both the immune system and renal disease on the outcome of tissue formation and wound healing. Moreover, we will be able to quantify the origin of the cells found in the scaffold in both circumstances (circulation- or tissue derived in health and disease), using the same techniques as **Step b** and **Step c**. Renal disease progression will be longitudinally monitored by taking blood and urine samples. By also adding the most promising bio-functionalization target to renal disease mice, we will be able to study the effect of renal disease on the tissue formation and wound healing in presence of a bio-functionalization target. This will allow us to validate the workflow and double check the importance of a promising bio-functionalization candidate in a second kidney disease model in a humanized immune environment.

To accomplish our goals, we will use an immunocompromised mouse transplanted with human stem cells (hematopoietic stem cells, CD34+) after irradiation to inactivate the immune system. By studying human- and mouse markers in the scaffold, we can characterize the contribution of different cell-types and their source. Renal disease will be induced for instance by supplying deoxycorticosterone acetate (DOCA) with a S.C. implant and adding salt to the diet (Fontes et al., 2015; *Cardiorenal Med.*). In the mouse, we have chosen a different renal disease induction than used in the CKD rat. Besides the fact that mice in general are less susceptible to developing renal disease using the surgical method, we believe that a surgical intervention in our humanized mice will lead to higher mortality. Therefore a non-surgical method leading to renal disease is preferred. In this study, as described above, important outcome variables include the effect of bio-functionalization and renal disease on the presence of human cells in the scaffold.

As clarified in 3.4.2 and 3.4.3, the experimental part of this project will only commence after we have completed **Step (c) of Appendix 1**, so we can apply both the technical advances and

knowledge.

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

In this project we want to compare a humanized model to age-matched immunocompromised mice (Step (b) and (c)). There are several suitable mice into which human cells can be introduced, e.g. SCID/Bg mice, RAG2 $-/-$ γc $-/-$, NOD/SCID/IL-2R γ null (NSG), see van Rijn et al., 2003; Immunobiology for overview and **Figure 1**.

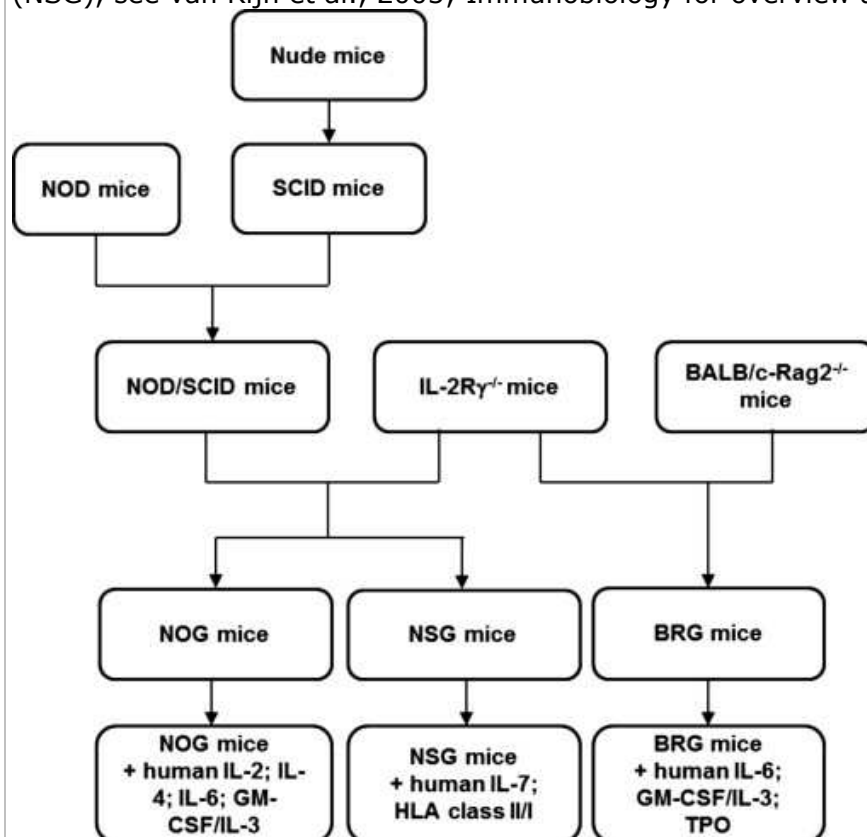


Figure 1: A simplified schematic overview of the historical development of various immunodeficient mice for

humanized mouse models (Denayer et al., 2014; New Horizons Transl. Med.)

By introducing human stem cells in these mice, we can study the contribution of human cells versus murine cells. The most important decision-making step is to select the appropriate model for this project. In the decision-making phase (**Step a**) we have to choose between a higher engraftment of human cells or to a more favorable outcome after *in situ* TE. This is explained by the fact that the less effective the immune system is, the more human cells will be able to engraft. However, a very weak immune system will not be able to adequately react to implantation of a scaffold, since the response to injury (and thus healing) is also abated. In the decision-making phase, we will choose which approach is most relevant for our study question and which model is most suitable for this purpose. During this phase, the sensitivity of the model to develop renal disease also has to be taken into account.

When this mouse model is established, we will wait with the vascular scaffold implantations until **Step c of Appendix 1** has been completed (see also work flow Figure in 3.4.3.). Once a most effective bio-functionalized target has been chosen in Appendix 1, we can implant a vascular scaffold and determine (**Step b**) the effect of a human circulation on scaffold outcome.

In Step b, we will first sub lethally irradiate the mice. Dose and duration will be based on the chosen mouse. On the same day after irradiation, stem cell transplantation will be performed, dose will also be dependent on the mouse and may be optimized in a pilot-study. Chimerism (percentage of human cells engrafted in the mouse) will be measured approximately 3 months post-transplantation. Before the scaffold is implanted, baseline measurements will be taken including non-invasive blood pressure, blood and urine. Approximately [REDACTED] after the implantation, the animals will be terminated. To gain as much information as possible from a single animal, we will perform different types of measurements. [REDACTED]

[REDACTED] After the experiment, we will explant the scaffold. Moreover, other relevant tissues (spleen, heart, remnant aorta and bone marrow) will be collected to assess morphology and cellular infiltrate and chimerism. Longitudinal non-invasive monitoring may consist of collecting blood and/or urine and determining blood pressure (e.g. every week).

As stated in **Step b**, animals will first undergo surgery to implant 'bare' scaffolds, after a model has been established. If the model is not compatible with the implantation of an scaffold (e.g. survival < 50%), this is considered a 'no go' moment and in close consultation with the IvD, decisions will be made concerning following steps.

In Step c, we can determine the influence of different bio-functionalization targets [REDACTED] of the scaffold on functional outcome. The experimental set-up and readout parameters will be similar to **Step b**. In combination with the results of Appendix 1, we will choose the most functionally effective bio-functionalized scaffold to proceed to a model of renal disease (**Step e**).

In Step e, renal disease will be induced on top of the methods described in **Step b/c**. DOCA and high-salt will be given for approximately 8 weeks before sub lethal irradiation and stem cell transplantation. After the mice have recovered from the transplantation, DOCA-salt diet will be started again and maintained until the end of the experiment. Similar to **Step b/c**, the implantation will take place approximately 3 months after stem cell transplantation. The scaffold will be explanted approximately

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

To minimize technical failure, experimental surgery in Appendix 2 will only commence after experiments in Appendix 1 have been completed. This will ensure increased technical skills plus experience in working in a disease model.

To avoid experimental variation, all groups will be studied longitudinally in balanced cohorts until the total group size matches the power analysis on the main outcome variables. Important outcome variables include the presence of human cells in the scaffold,

Minimizing the number of animals is partially determined by **Step a**, choosing a model. We will first focus on comparing existing models in engraftment and survival after sub lethal irradiation, induction of renal disease, and reconstitution with human bone marrow, both by meta-analyzing available literature and talking to experts in the field who have experience with breeding, housing and maintaining these animals.

Animals in the transplantation group will only be included into the experiment when chimerism exceeds >20% 3 months after stem cell transplantation. Animals that do not reach the chosen threshold will be excluded. It is estimated that about 90% of the animals will show >20% engraftment (van Rijn et al., 2003; Immunobiology). Rejection of the humane stem cells may result in acute graft-versus-host-disease (aGvHD) and development of aGvHD is dependent on multiple factors (Schroeder and DiPersio, 2011; Dis Model Mech). GvHD accounts for 15–30% of deaths that occur following allogeneic stem cell transplantation (Ferrara et al., 2009; Lancet). To prevent aGvHD, irradiation levels should be minimized but the mice strain here is again of importance and should be discussed with experts in the field. Decreased survival and reaching of a humane-endpoint (HEP) is however to be expected in these experiments, due to follow-up after irradiation and aGvHD after bone marrow-transplantation and scaffold implantation. We also expect to see scaffold-placement dependent reaching of HEP due to (partially) defective wound healing in bone marrow-reconstituted animals and due to paralysis. Irradiation mortality (or other technical failure) and reaching of HEP during follow-up is expected to range from 20% to 50%, depending on the ultimate dose and strain used (Mazurier et al., 1999; J Interferon Cytokine Res.). While non-reconstituted animals will be not be able to develop aGvHD, reaching of HEP and mortality is assumed to be lower.

Thus, we estimate a total survival of 50% for the CD34+ group and 70% for CD34- group.

To show how we have calculated the amount of animals necessary for our experiments, an example showing an experiment with 5 experimental groups representative of **Step c** is given.

In this example, we will only compare humanized animals. A mouse without a functional immune system but transplanted with human stem cells is indicated as 'CD34+' (human hematopoietic stem cells positive) in this scheme.

- 1) CD34+ + bare scaffold
- 2) CD34+ + [redacted] scaffold
- 3) CD34+ + [redacted] scaffold

- 4) CD34+ + [redacted] scaffold
- 5) CD34+ + unidentified target scaffold

In a previous study, we found that changing the biomaterial leads to a significant difference in [redacted]. Since bio-functionalization experiments have previously not been performed, the change of biomaterial in this setting is taken as an approximation for this phenomenon. In this study, the effect size was 2,21, with n=12 per group (calculated power = 0.99). As an example of primary readout, the number of [redacted] positive cells is used.

With an effect size = 2.21, Power = 0.8 and alpha = 0.05 corrected for 5 experimental groups, we calculated the number of animals necessary using F-test for ANOVA: fixed effects, omnibus, one-way. **The outcome was n = 10**, specific for the readout parameter [redacted]. However, depending on the model of choice, [redacted] may be altered in our model. Therefore, we believe that the total n should be increased compared to the calculated amounts.

B. De dieren

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

Choice of model, origin and age

Step a will function as our 'go/no go' moment in this project, which will be in close coordination with the IvD. Irrespective of the chosen model, animals will be ordered from an official breeder, preferably national. The sex of the animals in this experiment is not thought to play an important role and therefore both sexes will be used. Before we can proceed to **step b**, the irradiation dose and amount of CD34+ cells to be administered have to be determined, since both are believed to have a model-dependent optimum.

In a pilot study, 3 doses of irradiation (e.g. 'low', 'mediocre' and 'high', exact doses will be determined based on the chosen mouse) may consecutively be tested in this mouse, starting with the lowest dose in order to minimize distress. The goal of this pilot study is to optimize the chimerism versus implantation bias.

With n=10 per group, we will be able to follow-up survival as determined by effectiveness of irradiation and the subsequent possibility of CD34+ cells (by single dose as derived from literature and discussed with experts in the field) to engraft and generate new immune cells (CD34+) as compared to survival of irradiated animals without reconstituted immune system (CD34-). All these animals will also undergo graft implantation, to mimic the experimental setup as closely as possible. This generates 2 groups for which 3 different irradiation doses have to be tested, total of 6 experimental groups. When no differences can be found in outcomes (e.g. survival and chimerism), the lowest irradiation dose possible will be chosen. After dose optimization, we will also test 3 different doses of CD34+ cells (e.g. 'low', 'mediocre', which will be equal to the amount given in the irradiation experiment, and 'high'). Exact doses will be determined based on the chosen mouse and will be derived from literature and discussed with

experts in the field). All these animals will also undergo graft implantation, to mimic the experimental setup as closely as possible. This will generate an additional 3 experimental groups. When no differences can be found in outcomes (e.g. engraftment and chimerism), the lowest number of cells (e.g. lowest injection volume) possible will be chosen.

step b will not be initiated if none of the CD34+ or CD34- groups have a survival that is less than 50%. Therefore, **step a** can function as a 'go-no go' moment.

Step a will give a total of 9 experimental groups with n = 10.

Total N = 90

Step b will realize 2 experimental groups; immunocompromised model + scaffold (CD34-) versus human stem cell reconstituted mice (CD34+) + scaffold. Irradiation and transplantation will take place in adult animals, to correct for older age in animals receiving the DOCA + salt treatment in **Step e**.

Amount of animals

For **Step b**, based on a terminal group size of N=15 - 25 and 2 experimental groups

Total N= 30 - 50 for CD34+

Total N=21 - 35 for CD34-

For **Step c**, we will choose three currently known targets for bio-functionalization: [REDACTED] and 1 unknown candidate (or combination of known candidates) that emerges from the *in vitro* and *in vivo* data obtained from Appendix 1 **Step a/b**. Based on a terminal group size of N=15 - 25 and 10 experimental groups

Total N= 300 - 500 for CD34+

Total N= 215 - 360 mice for CD34-

For **Step e**, we will choose the most effective bio-functionalization target based on **Step c** Appendix 1 and **Step d** Appendix 2. Based on a terminal group size of N=15 - 25 and 4 experimental groups

Total N= 60 - 100 mice for CD34+

Total N= 42 - 71 mice for CD34-

Therefore, in total for the studies described in Appendix 2 we estimate that we will need a **maximum of 1206 mice**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Multiple immunocompromised mice are available for this type of research. However, the introduction of a human circulation is not straightforward and efficacy of engraftment is strain-dependent. Depending on the genetic mutation, some strains are more or less prone to engraft human cells and develop side-effects such as acute graft-versus-host disease (van Rijn et al., 2003; Immunobiology). Moreover, these strains may differ in their susceptibility to develop renal disease. It is thus important to select the right model to realize **Step b – e**. Currently, we are uncertain which model is most suitable for this project. Once we know which percentage of engraftment we can realize without abating the response to injury too much, we can make our decision.

The rationale for performing this study *in vivo* will be based on previous *in vivo* and *in vitro* studies. All our *in vivo* data will be complemented in parallel with *in vitro* data. However, *in vitro* data alone will not give us sufficient insight into this process, due to factors such as signalling from and to the bone marrow, and the effect of renal disease on all these processes. Such factors are only present *in vivo*.

To reduce the total amount of animals (surplus), both sexes will be used during this experiment. As for refinement, all surgeries will be performed by experienced surgeons. Animals will be group-housed and given cage enrichment if possible. Irradiation and stem cell transplantation will be performed in consultation with experts in the field. A optimized protocol for pain relief after implantation of the abdominal scaffold will also be included with the help of veterinarians. An optimized protocol to provide anti-thrombogenic therapy in animals lacking patent blood flow after the implantation surgery is currently in preparation together with experienced nephrologists.

It is well known that the immune response of mice is not completely congruent with that of humans (Mestas and Hughes, 2004; J. Immun.). Thus in mice, inflammatory processes in response to *in situ* TE scaffold implantation may not be fully representative of the human situation. To approximate the clinical situation as much as possible, we believe that a humanized mouse can help in answering our research questions. Humanized mouse models are considered extremely useful as they permit functional research studies *in vivo* and hence support clinical translation. Immunocompromised mouse models transplanted with human stem cells have not been used to assess functional outcome in *in situ* TE yet. Moreover, inducing renal disease in such models has also not been performed previously (Searched on PubMed). Therefore, our studies are innovative and will be able to answer fundamental questions concerning *in situ* TE in health and disease.

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

Currently, we are working on collaborations to determine the optimal mouse for this project. There are multiple centers that have experience

with working with immunocompromised animals. They will be able to advise us on optimal irradiation doses, post-irradiation care, commonly seen side effects and susceptibility of these models to renal disease.
Extensive training is given to optimize these complex surgical procedures before the start of the experiment.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

x Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee> Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee> Ga verder met vraag I.

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

Nee >Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

x Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

After sub lethal irradiation, animals may lose weight and develop inflammation specifically of the intestinal tract
After stem cell transplantation, animals may develop acute graft-versus-host disease (aGvHD)
After implantation of the scaffold, both the site of implantation and the intestines may get infected.
After implantation of the scaffold, animals may experience discomfort due to pain and paralysis

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Lethal irradiation can directly affect cells in mitosis (cell division), since it causes DNA-damage. Besides the cells of the immune system and the bone marrow, cells from the intestinal tract are very sensitive to irradiation. Irradiation may induce cell damage, which in turn leads to inflammation (Robbins et al., 2015; Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.) and subsequent weight loss.

After stem cell transplantation, activated donor (human) T cells traffic and cause cytotoxicity in the gut, skin, liver, lung, thymus and lymph nodes (Schroeder and DiPersio, 2011; Dis. Model. Mech.).

During the implantation surgery, the intestines have to be removed from the abdominal cavity to allow access to the aorta. This may lead to intestinal infections post-surgery. The incision length over the linea alba stretches from just below the diaphragm until the genital area and may also get infected after closure.

After the implantation surgery, a thrombus from the aorta may get stuck in smaller arteries, resulting in pain. A larger thrombus may obstruct a larger artery (e.g. arteria femoralis) leading to paralysis of (a) hind limb(s).

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

Experienced personnel will perform sub lethal irradiation and stem cell transplantation will be performed by experienced personnel and optimized in small pilot study.

All animals will be monitored closely after sub lethal irradiation, stem cell transplantation and implantation surgery for changes in general clinical characteristics. Mice are known to be able to lose up to 25% of body weight within 14 days after irradiation. Mice receiving total body irradiation and a bone marrow transplant will lose 10% to 20% of total body weight within the first 4 or 5 days, but then recover. Mice undergoing aGvHD will have a similar initial drop in weight but will recover more slowly or will undergo a continuing decline in weight (Hakim et al., 2011; Curr. Protoc. Immunol.).

After irradiation and stem cell transplantation, up to 21 days, mice will be checked every other day by the responsible investigator. Animals will be checked for motility and cleaning behavior, weight, temperature and loss of fur.

Possible interventions in animals with altered clinical characteristics include individual housing, altered diet (water-based powder chow) and an increased or prolonged amount of analgesia. Salt can also temporarily be retracted from the diet in renal disease animal. In close consolidation with the IvD, animals that show no improvement in health will be excluded and killed.

All surgeries will be performed by experienced staff (2 persons simultaneously), to decrease overall surgery time and specifically the ischemia-time. After implantation of the scaffold, patency of the scaffold will be assessed while the animals are still under

anesthesia. When patency cannot be assured due to the presence of a thrombus, anti-thrombolytic therapy (e.g. Plavix) can be administered. Animals that show patency of the graft will still be checked the first 7 days for hind-limb ischemia (see J, humane eindpunten).

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tight evaluation of the animals will be performed to prevent mortality. Our first HEP (1) will be follow-up after irradiation and stem-cell transplantation. Irradiation-related side effects include weight-loss, intestinal bleeding, infection and anaemia (Robbins et al., 2015; Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.). Stem-cell transplantation related side effects include weight-loss, ruffling of hair and decreased mobility. If there is a decrease in weight (> 25% within the first week or acute drop 15% or more in 2 days) and/or a combination of other symptoms, the animal will be excluded and killed. Our second HEP (2) will consist of assessing the patency of the aortic scaffold after implantation. In the patency of the graft does not improve after anti-thrombogenic therapy and when the hind limbs of the animals appear to remain ischemic (cold, pale), the animal will be excluded and killed. Our third humane-endpoint (3) will consist of assessing limb-function at Day 1,2,3,5 and 7 after implantation surgery using the cage-lid test. If one of the limbs fails this test, the animal will also be excluded and killed. The fourth HEP (4) will consist of monitoring weight loss, infection and general health after implantation, with the same exclusion criteria as HEP (1).

The most common signs of increased discomfort in the current study will be:

- 1) Irradiation and stem-cell transplantation related side-effects, most likely weight-loss
- 2) Paralysis of the hind limbs, visible in the first days after the implantation of the vascular scaffold
- 3) Persistent infection of the abdominal region after placement of the vascular scaffold
- 4) Paralysis of other limbs and necrosis of tissue due to occlusion of the vascular scaffold

All these signs will serve as exclusion criteria and the animals will subsequently be killed to prevent increased discomfort and mortality. No direct side effects are expected from the DOCA-salt model, but the hypertension could initially impact on implantation surgery.

For the implantation of the vascular scaffold, it is necessary to temporally clamp the aorta to prevent bleeding. In some cases, this ischemia and subsequent reperfusion can lead to irreversible damage in downstream tissues of the abdominal aorta. A clear example of this damage is paralysis of the hind legs. To evaluate hind-limb paralysis, the cage-lid test will be performed. If the cage-lid test is positive and either one of more limbs fail to grab, a humane endpoint will be reached and the animal will be humanely euthanized.

Moreover, when general clinical characteristics change and we expect the ongerief to shift from 'matig ongerief' to 'ernstig ongerief', such as an acute drop in weight (15% or more in 2 days), a humane endpoint is also reached. We will thus humanely kill all animals within 'matig ongerief' expected to deteriorate in health in such a way that 'ernstig ongerief' will be reached. If 21 days after irradiation weight is not back

to pre-irradiation levels, a humane endpoint is also reached.

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

Decreased survival is to be expected, both due to irradiation and bone marrow-transplantation and due to scaffold implantation. Irradiation mortality and reaching HEP during follow-up is expected to range from 20% to 50%, depending on the ultimate dose and strain used [45]. We also expect animals to reach HEP due to scaffold-placement dependent thrombus formation due to (partially) defective wound healing in BM-reconstituted animals and due to paralysis. We expect an average of 15% of the implanted animals to reach this HEP, with 10% excluded during surgery after anti-thrombogenic therapy and 5% after a positive cage-lid test. The remaining 5% will be tested at several time points after the implantation surgery and excluded whenever the cage-lid test is positive for one or more limbs.

CD34- animals will undergo irradiation (15% HEP (1)) + scaffold implantation and follow up (15% HEP 2,3,4).

CD34+ animals will undergo irradiation (15% HEP (1)) + stem-cell transplantation (20% HEP (1) due to GvHD) + scaffold implantation and follow up (15% HEP (2,3,4)).

Thus we estimate a humane endpoint for 50% of the CD34+ group and 30% of the CD34- group.

K. Classificatie van ongerief

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

This experiment is determined as 'matig ongerief'. All animals will undergo sub lethal irradiation and one surgical event plus short-term follow up (scaffold implantation). Some of the animals will also undergo stem cell transplantation. Induction of renal disease is not expected to give any side effects. Animals that will be excluded and killed during the implantation will also experience 'matig ongerief' due to preceding irradiation with or without stem cell transplantation. Animals excluded during surgery (estimated 10%) will not experience extra discomfort since they will be killed under anesthesia. The remaining 5% will be tested at several time points after the implantation surgery and excluded whenever signs of paralysis emerge. Since the first 48h after surgery, analgesia will be given and 2 cage-lid test are performed during this time-frame, we also estimate the discomfort of these animals 'matig ongerief'.

As described, we want the animals in this experiment to have a maximum of 'matig ongerief', due to the nature of the interventions and the duration of the experiments. All animals with deteriorating health will be humanely killed before reaching 'ernstig ongerief'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Animals will be sacrificed at different time points after implantation since extensive work will be conducted on morphology of the scaffold

using immunohistochemistry [redacted] and specific (Western Blot (WB) and quantitative expression (qPCR) respectively. Longitudinal, terminal and post-mortem measurements will allow correlation between morphology of the scaffold and expression profiles in humanized and control animals.

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

Nee >Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015310

Uw referentie

18 DEC. 2015

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte [REDACTED]

Op 9 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Influence of non-conventional CV risks due to CKD on aortic vascular graft in situ TE" met aanvraagnummer AVD115002015310. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

U heeft uw aanvraag aangevuld op 5 december 2015 en op 14 december 2015

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Afwijkend van uw aanvraag is het aantal dieren voor training beperkt tot het aantal benodigd voor de uitvoer van dit betreffende project. Voor overige trainingsdoeleinden dient u een aparte projectaanvraag in te dienen. U kunt met uw project "Influence of non-conventional CV risks due to CKD on aortic vascular graft in situ TE" starten. De vergunning wordt afgegeven van 18 december 2015 tot en met 1 december 2020. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Er zijn vragen gesteld aan de DEC en de aanvrager.

Wij hebben toelichting op gevraagd op het aantal dieren dat ten behoeve van chirurgische training is aangevraagd. In bijlage 3.4.4.2 ontbrak een specificatie van het aantal dieren om een pilot studie voor het bepalen van de juiste stralingsdosis uit te voeren.

U heeft op 5 december 2015 een aantal documenten uit uw aanvraag herzien en een nieuwe bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2 en een herziene NTS aan ons gestuurd.

Het aantal dieren voor chirurgische training is beperkt tot het aantal benodigd voor deze aanvraag en niet voor algemene onderwijsdoeleinden, daarom heeft u op 14 december 2015 nogmaals een herziene bijlage 3.4.4.1 en NTS aan ons gestuurd.

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-Utrecht gevoegd.

Datum
18 december 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015310

Dit advies is opgesteld op 3 november 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 2 december 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie, aangevuld met de antwoorden op de vragen. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Met het oog op artikel 10 lid 1a van de wet worden twee algemene voorwaarden toegevoegd.

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

Bezwaar

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

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

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

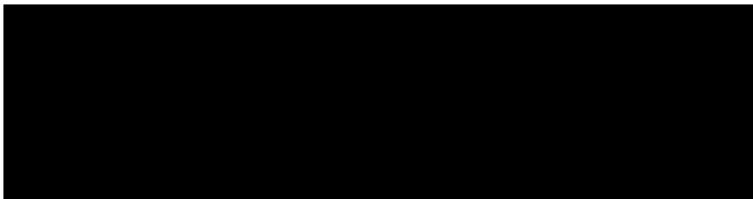
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 18 december 2015 tot en met 1 december 2020, voor het project "Influence of non-conventional CV risks due to CKD on aortic vascular graft in situ TE" met aanvraagnummer AVD115002015310, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 november 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 9 november 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 14 december 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 3 november 2015, ontvangen op 9 november 2015
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag bijlage 3.4.4.2 ontvangen op 5 december 2015
Bijlage 3.4.4.1 ontvangen op 14 december 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Influence of CKD on TE aortic vascular scaffolds in the rat	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) sprague dawley	150 training 694	Matig / moderate
Infiltration and early tissue formation of tissue-engineered aortic vascular scaffolds in a humanized mouse model with renal disease	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / immuundeficiente muizen	1206	Matig / Moderate

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

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

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of 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 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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



Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 4 januari 2016 14:10
Aan: 'dec-utrecht@umcutrecht.nl'
Onderwerp: terugkoppeling aanvraag projectvergunning AVD115002015310

Geachte DEC,

Op 9 November hebben wij een aanvraag voor project vergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project: "Influence of nonconventional CV risks duet o CDK on aortic vascular graft in situ TE" met nummer AVD115002015301.


Op 1 december 2015 hebben wij u een brief gestuurd met de vraag om aanvulling op een aantal punten. U heeft deze vragen op 2 december 2015 beantwoord, en daarna hebben wij de aanvrager en onderzoeker toelichting gevraagd op dezelfde punten.

De vragen betroffen het relatief hoge aantal dieren om de chirurgische ingreep te oefenen en een uitwerking van de beschreven pilot studie om de bestralingsdosis vast te stellen en het aantal dieren dat voor de pilot studie ingezet zal worden.

De CCD heeft besloten de vergunning voor het aangevraagde project, overeenkomstig uw advies, te verlenen. Afwijkend van de aanvraag en uw advies heeft de commissie besloten het aantal dieren voor training terug te brengen tot benodigd voor dit project en de aanvrager verzocht een aparte aanvraag voor algemene trainingsdoeleinden in te dienen.

In overleg met de onderzoeker is het aantal dieren benodigd voor training voor dit project vastgesteld op 150 ratten. Ook is de pilot studie uitgewerkt en is een aantal van 90 muizen toegevoegd verdeeld over 2 pilotstudies. De bijlagen dierproeven en de Niet technische samenvatting zijn overeenkomstig aangepast.

Mocht u nog vragen hebben dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen,

Met vriendelijke groet, 

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Inventaris Wob-verzoek W16-10S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016418								
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	
11	Mail beschikking 14-3-2016				x		x		
12	Mail terugkoppeling DEC 14-3-2016				x		x	x	

11 FEB. 2016

AVD 103002016418



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101, t.a.v. [REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB</td> <td>Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein	10	Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]		Postcode en plaats	6500HB	Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983		Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud	
Straat en huisnummer	Geert Groteplein	10															
Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]																
Postcode en plaats	6500HB	Nijmegen															
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<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 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 9 _ 0 3 _ 2 0 1 6
- Einddatum 0 9 _ 0 3 _ 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het evalueren van een potentieel nieuw geneesmiddel voor de behandeling van Parkinson
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.441,00 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, factuurgegevens

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

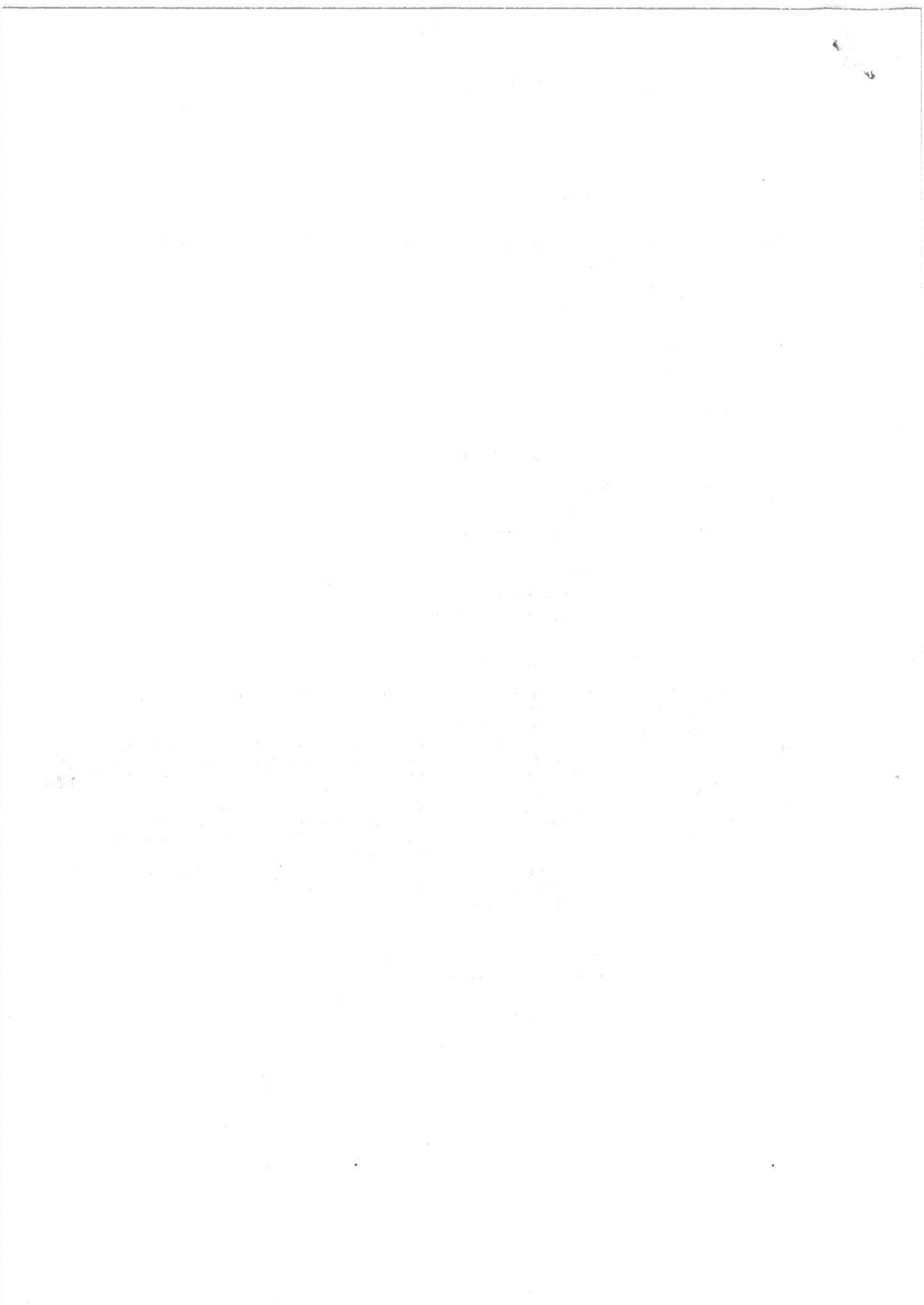
Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 09 - 02 - 2016

Handtekening [REDACTED]



Form Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease

2 Categories

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

Forensic enquiries

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurological disorder that is increasingly prevalent with age, with the incidence rising from approximately 4 people per 10,000 in their forties to 2 in 100 over the age of eighty. Major PD characteristics are tremor, slowness of movement, rigidity, postural instability, abnormal gait and loss of dopaminergic neurons in substantia nigra.

Current evidence from postmortem human brain tissue, genetic- and toxin- induced animal and cellular models indicate a central role of mitochondrial dysfunction, leading to a cellular redox imbalance and increased oxidative stress, which has been conclusively established as a common denominator for a significant subset of monogenic and idiopathic forms of PD (1). Mutation in at least 7 genes (ATP13A2, DJ-1, LRRK2, Parkin, PINK1, SNCA, VSP35) are known to underlie monogenic PD, most of them encode proteins that impact mitochondrial function and clearance, cellular oxidative stress and redox balance (2, 3).

Mutations in DJ-1 and PINK1 genes have been associated with mitochondrial dysfunction and oxidative stress in different models of PD (3, 4-10). The protein encoded by the PINK1 gene is a serine-threonine kinase, which has been suggested to provide protection against oxidative stress by assisting in condemning damaged mitochondria to degradation/mitophagy and maintaining mitochondrial homeostasis (11). The exact function of the DJ-1 protein has not been fully elucidated, it is thought to serve as a sensor of oxidative stress switching its isoelectric point to a more acidic form following oxidative stress (12).

Recently, novel rat knockout (KO) models of DJ-1 and PINK1 genes were generated and characterized (4, 13-15). In contrast to mice, the loss of either DJ-1 gene or PINK1 gene in rats results in a marked behavioral dysfunction and significant loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, both major characteristics of PD (8, 13-15). DJ-1 and PINK1 KO rats display significant reduced rearing frequency, impaired hindlimb strength and abnormal gait (13). PINK1 (but not DJ-1) showed decreased total distance moved in the open field and increased foot slips measured by the tapered balance beam test (13). Tremor was not seen in both KO rat models. Both KO rat models show 2-3 fold increase in striatal neurotransmitters dopamine and serotonin at the age of 8 months (13). Mutations in the DJ-1 and PINK1 genes both in patients and KO rat models are characterized by early age of onset. Currently, limited information is reported about the neuropathology in patients with the PINK1 and DJ-1 gene mutations. These findings support the use of the DJ-1 and PINK1 KO rat models as relevant models for evaluating therapeutic efficacy of novel treatment strategies for PD. To date, no pharmacological intervention studies in these genetic rat models are described.

Currently, there is no cure for PD. Multiple agents have been studied, designed to assess disease modification in PD, however they all have failed in clinical trials (16). Over the last 3 years, clinical trials investigating the potential of adeno-associated virus serotype 2 (AAV)-neuturin, coenzyme Q10, creatine, pramipexole, and pioglitazone reported negative findings or futility (16). Continuous progress has been made by expanding the understanding of molecular pathways involved in PD to reveal new targets, and by developing novel animal models of PD for preclinical studies such as the DJ-1 and PINK1 KO rats.

The present project aims at evaluating the therapeutic potential of KH176 in DJ-1 and PINK1 KO rat models. KH176 is a clinical-stage (phase 1 successfully completed) new chemical entity, the frontrunner compound developed by a spin-off bio pharmaceutical company of the Radboud UMC Nijmegen. KH176 acts as an intracellular redox-modulating agent targeting oxidative stress. Recently, our research proposal aiming at the evaluation of KH176, as a potential therapeutic for PD, has been awarded by the Michael J. Fox Foundation (Therapeutic Pipeline Program 2015). KH176 has shown proof of efficacy in preclinical models of mitochondrial disease (in vitro and in vivo) (manuscript in preparation) and PD (in vitro) and has obtained designated orphan status in the EU (EMA) for "treatment of Leigh syndrome" (EMA/OD/068/14) and in the USA (FDA) for "treatment of inherited mitochondrial respiratory chain diseases". KH176 has already been synthesized in a GMP batch required for clinical development and has proven to be highly tolerable during the 28 days regulatory toxicology study in two animal species (rats and dogs). The first-in-man phase 1 clinical trial (Eudra 2015-001717-26) for mitochondrial disease is recently completed.

We hypothesize that KH176 will act as a neuroprotective agent by restoring or preventing the cellular redox imbalance, particularly in dopaminergic neurons, and ultimately prevent and/or delay the manifestation of PD. KH176 is both a free-radical scavenger and redox modulator. Many free radicals scavenging antioxidants have shown only little benefits in human diseases including PD. Free radicals are short-lived molecules produced by specific enzymes at specific localization and compartmentalization in the cells, therefore free radical scavengers will differ in their efficacy depending on their targeting. Indeed, to be able to scavenge free-radicals the antioxidants must be in close vicinity to the specific enzyme responsible for their production. KH176 has been shown to efficiently scavenge cellular free-radicals such as superoxide while many other known antioxidants were unable to do so. In addition, KH176 is a co-factor of an enzyme involved in the control of the cellular redox balance leading to the protection of cells against oxidative stress burden (confidential data).

1. Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO journal*. 2012;31(14):3038-62.
2. Verstraeten A, Theuns J, Van Broeckhoven C. Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends in genetics* : TIG. 2015;31(3):140-9.
3. Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature clinical practice Neurology*. 2008;4(11):600-9.
4. Villeneuve LM, Purnell PR, Boska MD, Fox HS. Early Expression of Parkinson's Disease-Related Mitochondrial Abnormalities in PINK1 Knockout Rats. *Molecular neurobiology*. 2014.
5. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003;299(5604):256-9.
6. Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H. Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;312(4):1342-8.
7. Park J, Kim SY, Cha GH, Lee SB, Kim S, Chung J. Drosophila DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene*. 2005;361:133-9.
8. Meulener M, Whitworth AJ, Armstrong-Gold CE, Rizzu P, Heutink P, Wes PD, et al. Drosophila DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Current biology* : CB. 2005;15(17):1572-7.

9. Hoepken HH, Gispert S, Morales B, Wingerter O, Del Turco D, Mulsch A, et al. Mitochondrial dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6. *Neurobiology of disease*. 2007;25(2):401-11.
10. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, et al. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*. 2006;441(7097):1162-6.
11. Springer W, Kahle PJ. Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Autophagy* 2011;(7): 266-278.
12. Mitsumoto A, Nakagawa Y. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic. Res.* 2001; (35): 885-893.
13. Dave KD, De Silva S, Sheth NP, Ramboz S, Beck MJ, Quang C, et al. Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*. 2014;70:190-203.
14. Sun J, Kouranova E, Cui X, Mach RH, Xu J. Regulation of dopamine presynaptic markers and receptors in the striatum of DJ-1 and Pink1 knockout rats. *Neuroscience letters*. 2013;557 Pt B:123-8.
15. Baptista MA, Dave KD, Sheth NP, De Silva SN, Carlson KM, Aziz YN, et al. A strategy for the generation, characterization and distribution of animal models by The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research. *Disease models & mechanisms*. 2013;6(6):1316-24.
16. Kalia LV, Kalia SK, Lang AE. Disease-modifying strategies for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2015.

3.2 Purpose

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

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

The aim of this project is to evaluate the therapeutic potential of KH176, a new chemical entity, on Parkinson's Disease (PD) phenotype in PD animal models. We predict to find marked disease modifying therapeutic effects on one or more outcome measures.

We believe the work within this project can be achieved within the five-year period. Our collaboration with the Parkinson Center Nijmegen (ParC), will strengthen us in the Parkinson research field. Expertise concerning the behavioral studies such as the CatWalk gait analysis is present within our institute. Furthermore, collaboration with the Donders Institute will provide sufficient support and expertise for the microdialysis study. The DJ-1 and PINK1 KO rats are commercially available. The compound KH176 is available. Previous work showed proof of efficacy of KH176 in preclinical models of MD (in vitro and in vivo) (manuscript in preparation) and PD (in vitro).

3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

Our experiments will help us in the development of successful new therapeutics for Parkinson's Disease (PD) with underlying mitochondrial dysfunction.

Furthermore, the experiments will give new insight in the oxidative stress level and redox balance in blood and brain in the DJ-1 and PINK1 KO rat models compared to wildtype rats. Although, these models are well defined in the literature, this information is still lacking and will be helpful in the understanding of the pathology of PD.

Social relevance:

PD is a progressive neurological disorder that is increasingly prevalent with age, with the incidence rising from approximately 4 people per 10,000 in their forties to 2 in 100 over the age of eighty. Multiple agents have been studied, designed to assess disease modification in PD, however they all have failed in clinical trials. Therefore, there is a unmet need for the development of clinical effective treatments for PD.

3.4 Research Strategy

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

The overall research strategy is depicted in the flow chart below.

1) Dose selection study: to optimize the dosing and administration scheme

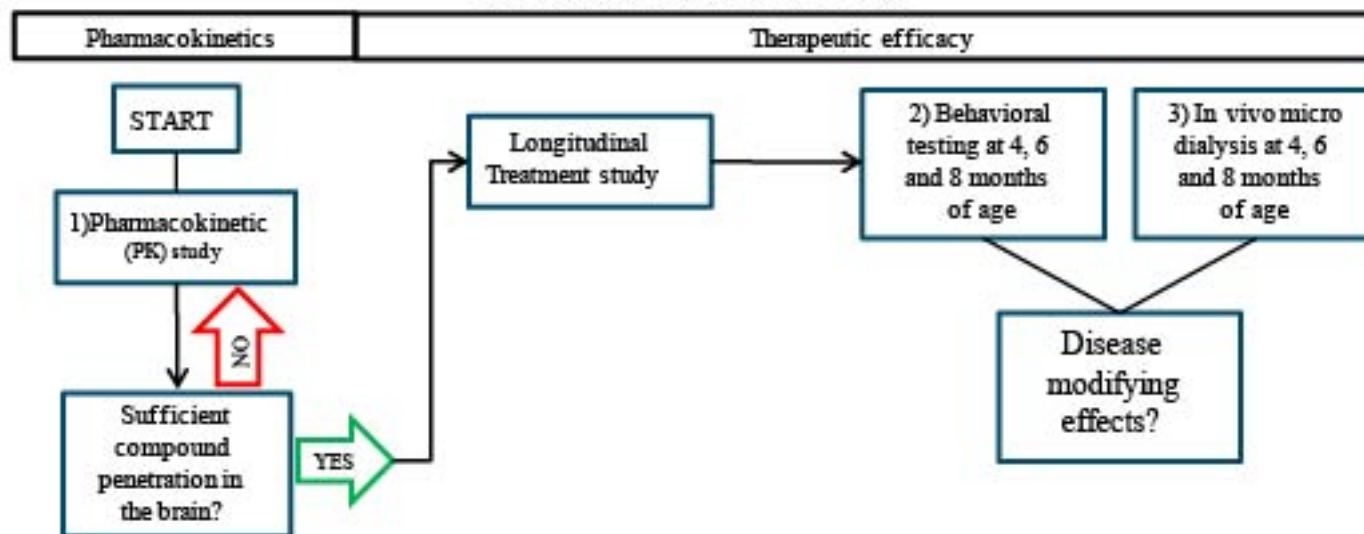
Longitudinal treatment studies:

2) Behavioral study: to test the therapeutic efficacy on behavioral outcome measures

3) Microdialysis study: to test the therapeutic efficacy on neurotransmitters and oxidative stress measures in the brain at different time points in the same animal

After successful completion of the dose selection study, the behavioral- and microdialysis study will be performed simultaneously. Since the implantation of the microdialysis probe will influence the animal behavior, two separate studies will be conducted. The compound can have an effect on outcome measures of either one of the two or both studies.

RESEARCH STRATEGY



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.

Animals used in each study (DJ-1, PINK1 and WT rats) will be bred. The genetically altered animals will have a PD phenotype, so the breeding will be considered with discomfort and is included in this proposal.

1) Dose selection study

The experimental set-up for this study is depicted below.

A) To reduce animal discomfort, oral administration (via food pellets) is preferred for the long term treatment studies. In the literature no information is given on significant differences in food intake between the DJ-1, PINK1 and WT rats, therefore we will measure the baseline food intake levels in all 3 animal groups for 7 days.

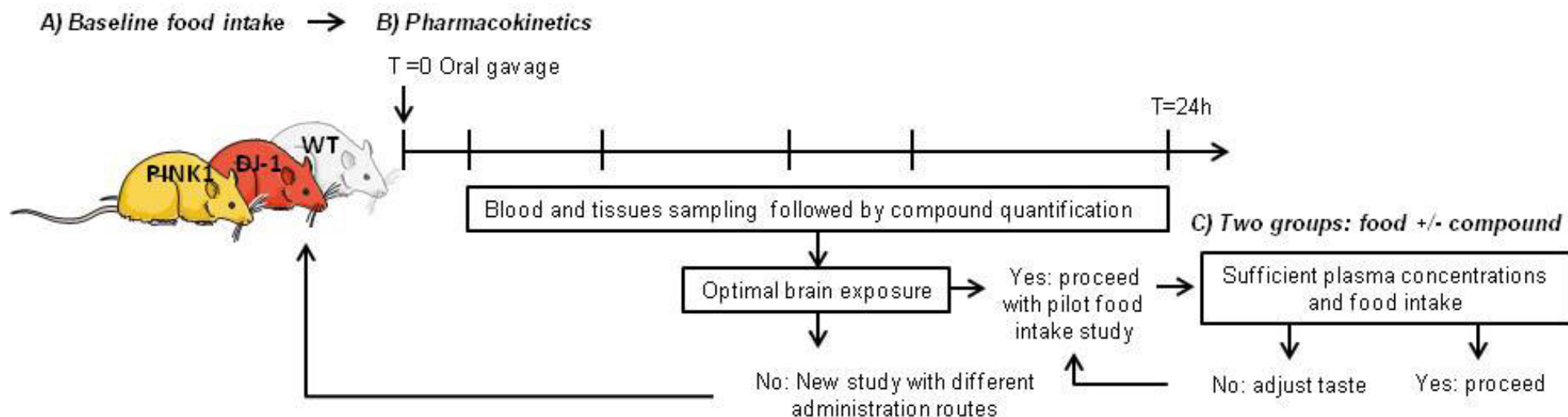
B) Since the pharmacokinetics (PK) may differ in the KO rat models compared to WT, this study will be performed in all three animal groups. After a single oral gavage at the starting time point (T=0), compound concentrations (in blood and tissue) will be evaluated at 5 different time points (latest time point is maximal 24 hours). Half life of the compound is the most important outcome and by experience of previous PK studies with KH176 in

rats we know that 5 time points will give a reliable measurement. Previous work has shown beneficial effects of KH176 on motor behavior (CatWalk and Rotarod) in mitochondrial complex I deficient (Ndufs4^{-/-}) mice. The related brain concentrations that we know from these mice studies will be used as an indicator whether optimal brain exposure is reached.

C) If optimal brain exposure is reached, a pilot study for food intake will be performed to rule out a potential specific taste of the compound which can influence food intake in the treatment group versus vehicle group. The compound will be mixed with grinded food pellets and administrated for 7 days. Food intake and compound concentration in blood and tissue (brain) will be used as outcome measures.

If oral administration is not resulting in a sufficient compound uptake (B), other administration routes will be considered (osmotic minipumps) and there will be no need to perform the pilot study (C).

1) Dose selection study

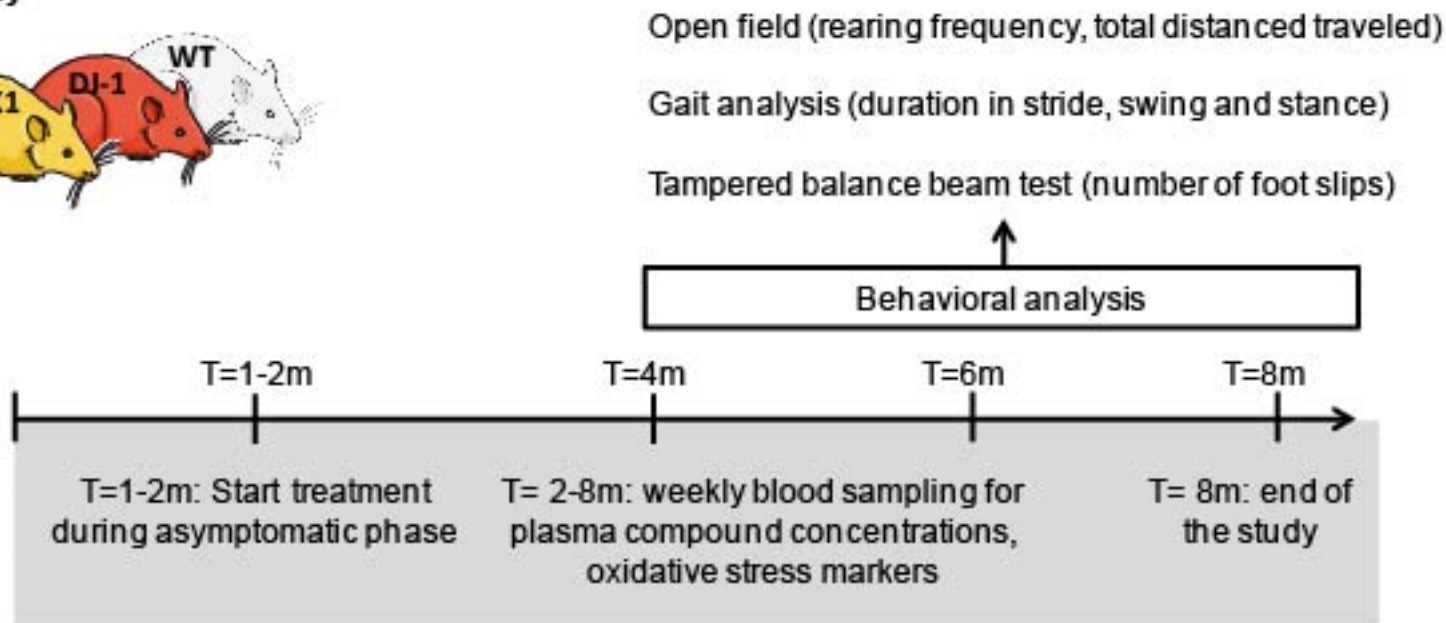


2) Behavioral study

Using WT, PINK1 and DJ-1 rats, long-term treatment will start during the asymptomatic phase at the age of 1-2 months, and preferably administrated via solid food pellets. To control for compound intake, body weight will be monitored daily and blood samples will be taken weekly to measure plasma concentrations. A significant decrease in the body weight of an animal or an insufficient plasma concentration will lead to the

exclusion of the animal from the study. The therapeutic effect of the compound will be evaluated on the following behavioral outcome measures at 4, 6 and 8 months of age, 1) mobility in open field (distance moved in cm), 2) rearing frequency, 3) gait abnormalities on CatWalk (duration in stride, swing and stance and 4) tapered balance beam performance (number of footslips).

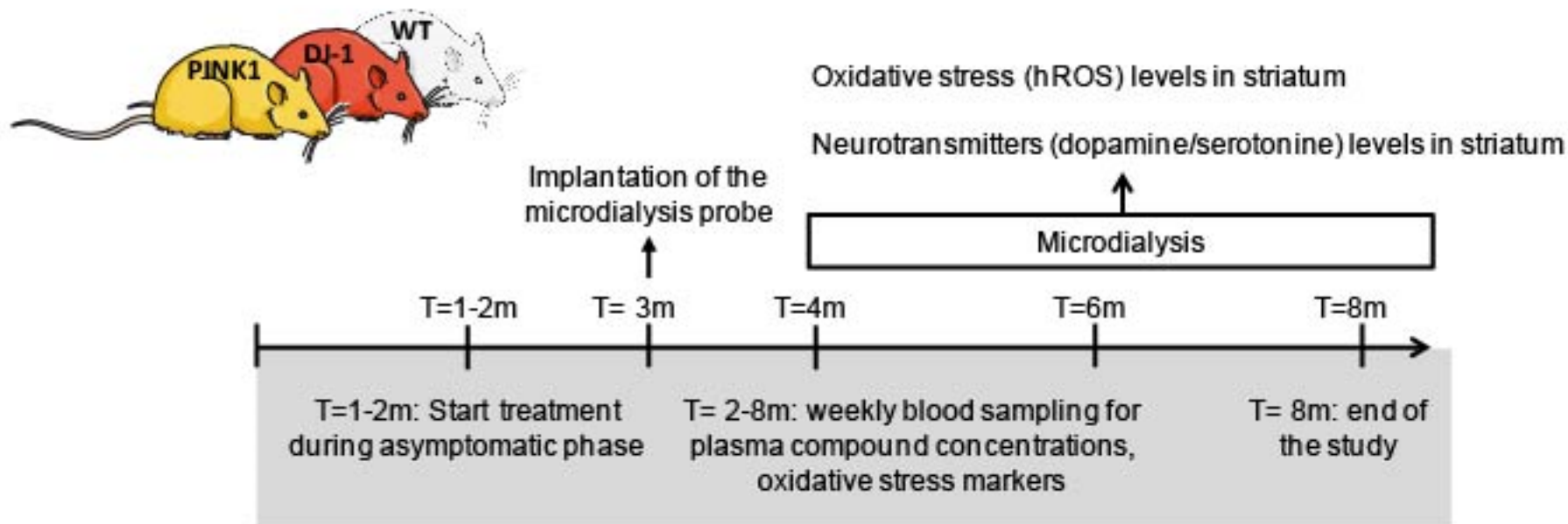
2) Behavioral study



3) Microdialysis

Using WT, PINK1 and DJ-1 rats, long-term treatment will start during the asymptomatic phase at the age of 1-2 months, and preferably administrated via solid food pellets. To control for compound intake, body weight will be monitored daily and blood samples will be taken weekly to measure plasma concentrations. A significant decrease in the body weight of an animal or an insufficient plasma concentration will lead to the exclusion of the animal from the study. All rats will be implanted with a guide cannula in the brain under isoflurane anesthesia at the age of 3 months. After a recovery period of at least 7 days, a microdialysis probe is inserted into the guide cannula to measure the extracellular levels of oxidative stress (hROS) and neurotransmitters using high-performance liquid chromatography equipment which is coupled to an electrochemical detector. Microdialysis will be performed at 4, 6 and 8 months of age. By using this method instead of sacrificing animals at each time point for immunohistochemistry, we will reduce the number of animals and also we have measurements at different time points within the same animal.

3) Microdialysis study



Note: More detailed information about the animal procedures can be found in appendix 3 of the animal procedures.

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

This project will provide vital information on the pharmacokinetics (PK) and therapeutic efficacy of KH176 in the DJ-1 and PINK1 KO rat models for Parkinson's disease (PD). The dose selection study is necessary for optimization of the dose and administration route of the compound, which will be used for the behavioral and microdialysis studies. Importantly, the dose selection study will be used to test whether the compound is able to penetrate the main target organ (the brain) sufficiently. If this is not the case, we will not proceed with this compound in the behavioral and microdialysis study.

The behavioral study will indicate whether the compound has beneficial therapeutic effects on different behavioral outcomes. Microdialysis will reveal the effect of the compound on the possible prevention or delay of the loss of dopaminergic neurons in the brain. Furthermore, the oxidative stress levels and redox balance in the brain will give us information about the target engagement of the compound. Combining these results will give insight in the relationship between the compound, behavior and neurochemical/redox changes in the brain.

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	Dose selection study
2	Longterm-Behavioral study
3	Longterm treatment-Microdialysis study

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

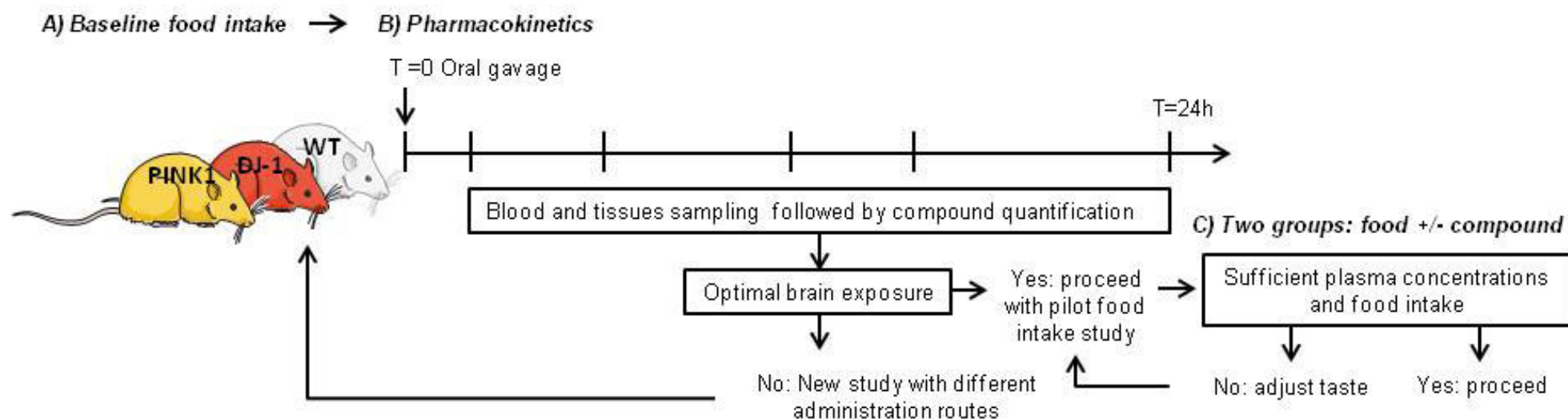
1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4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

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.

1) Dose selection study



1) Dose selection study

The first part of the project will focus on the optimization of the dosing scheme (route, concentration) that will be used for the long-term treatment. Importantly, this study will be used to test whether the compound is able to penetrate the main target organ (the brain) sufficiently. If this is not the case, we will not proceed with this compound in the behavioral and microdialysis study. Animals used in this study (DJ-1, PINK1 and WT rats) will be bred. The genetically altered animals will have a PD phenotype, so the breeding will be considered with discomfort.

A) To reduce animal discomfort, oral administration (via food pellets) is preferred for the long term treatment studies. In the literature no information is given on significant differences in food intake between the DJ-1, PINK1 and WT rats, therefore we will measure the baseline food intake levels in all 3 animal groups for 7 days (5 animals per group).

B) Pharmacokinetics may differ between DJ-1, PINK1 and WT rats, therefore we will perform this study in all three animal groups. After a single administration of the compound by oral gavage at the starting time point (T=0), compound concentrations will be evaluated at 5 different time points (latest time point is maximal 24 hours). Half life of the compound is the most important outcome. To minimize the number of animals, we know by our experience of previous PK studies with KH176 in rats that 5 time points will give a reliable measurement. At each time point, 5 animals will be sacrificed for compound measurements in blood and tissue. Previous work has shown beneficial effects of KH176 on motor behavior (CatWalk and Rotarod) in mitochondrial complex I deficient (Ndufs4^{-/-}) mice. The related brain concentrations that we know from these mice studies will be used as an indicator whether optimal brain exposure is reached.

- outcome parameters:

compound concentration in brain

compound concentration in plasma

adverse effects of the compound (unexpected changes in the animal's behavior e.g. no self-grooming or no food/water intake, when the animal does not respond to a stimulus anymore)

C) If optimal brain exposure is reached after oral administration, and no adverse effects are noted, a pilot study for food intake will be performed to rule out a potential specific taste of the compound which can influence food intake in the treatment group versus vehicle group. The compound will be mixed with grinded food pellets and administrated for 7 days.

- outcome parameters:

food intake

plasma compound concentration

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

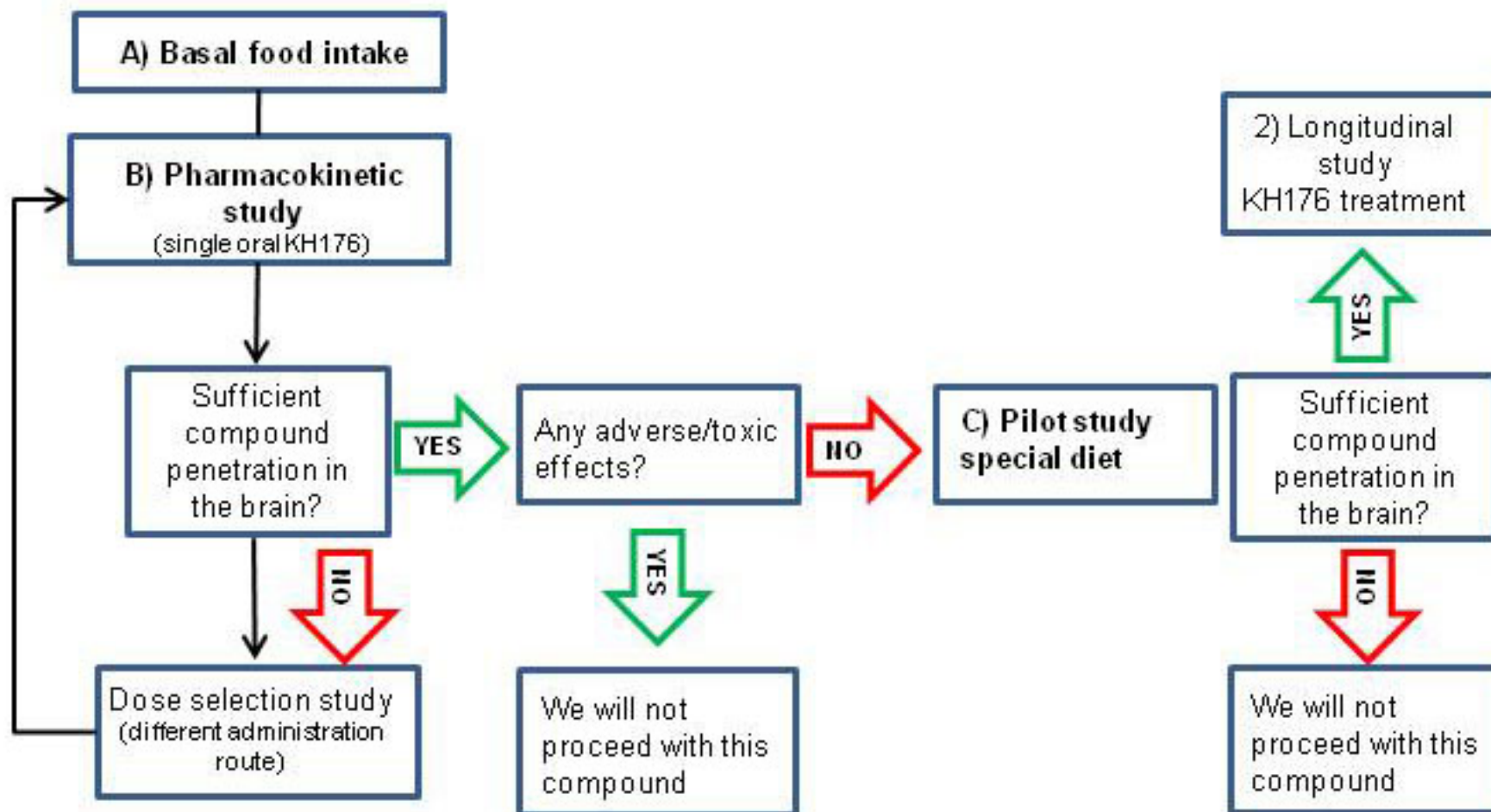
The proposed procedures for this study are the following:

- 1) Breeding pairs of DJ-1^{-/-}, PINK1^{-/-} and Long Evans Hooded (LH) rats will be ordered by Sage Labs. The LH rat is the background strain of the DJ-1 and PINK1 rats and considered as wildtype. For breeding, males and females will be paired, under normal housing conditions in our animal facility.
- 2) Measurement of baseline food intake levels of DJ-1, PINK1 and WT rats for 7 days.
- 3) DJ-1, PINK1 and WT rats will receive a single administration of the compound via oral gavage (procedure duration is 1-2min).
- 4) At 5 different time points, the latest of which will be 24 h post administration, rats will be placed under isoflurane anesthesia (procedure duration

is 2-3 min), blood will be collected via a heart puncture, followed by euthanasia. Brains and other tissues will be collected for the quantification of compound levels.

5) For the pilot study on administration through food pellets, DJ-1, PINK1 and WT rats will be fed special food with or without the compound for 7 consecutive days. Body weight and food intake will be monitored daily and at the end of the 7 days blood samples will be collected to measure plasma compound concentrations and the animals will be euthanized.

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



First baseline food intake levels will be measured in DJ-1, PINK1 and WT rats (n=5 per group) for 7 days.

A) Baseline food intake: 5 animals X 3 animal groups = 15 animals

Primary outcome of the PK study is to demonstrate what the systemic exposure (plasma) and tissue exposure (brain) is, following preferably oral administration or other administration routes. Based on pilot studies and prior pharmacokinetic studies reported in our group, 5 animals per time point are needed. To give sufficient information about the uptake of the compound in time, for each compound, 5 time points will be used.

B) PK oral gavage: 5 animals X 5 time points X 3 animal groups X 2 different doses = 150 animals

The results of the PK study with oral gavage will indicate whether oral administration is possible and what dose is resulting in sufficient tissue exposure. If oral administration is possible, the pilot food intake study will be performed to distinguish any effects of the compound on food intake, an estimated group size of 5 animals for each of the two groups (vehicle, compound) will be used. Variation in food intake in animals having similar age and body weight will be minimal, therefore we estimate 5 animals per group will be sufficient to indicate any positive or negative effects. This will only be performed for one dose.

C) Pilot food intake: 5 animals X 2 groups X 3 animal groups = 30 animals

If based on the PK study, oral administration is not resulting in a sufficient tissue exposure (brain), we will not proceed with the pilot food intake (C) but will repeat the PK study (B) with a different administration route (osmotic minipump).

B) PK osmotic minipump: 5 animals X 5 time points X 3 animal groups X 2 different doses = 150 animals

Total 15 + 150 + 30 + 150 = 345 animals (115 per animal group)

Breeding information for each animal group:

Mean number of 8 pups per litter

Ratio male/female is 50/50

Breeding success of 80%

DJ-1: 20 breeding pairs, gives 16 expected litters X 8 pups = 128 pups

To be registered: 40 DJ-1 breeding animals + 128 pups = 168 rats

PINK1: 20 breeding pairs, gives 16 expected litters X 8 pups = 128 pups

To be registered: 40 PINK1 breeding animals + 128 pups = 168 rats

WT: 20 breeding pairs, gives 16 expected litters X 8 pups = 128 pups

To be registered: 115 pups used in the experiment.

Grand total: 168 DJ-1 + 168 PINK1 + 115 WT rats = 451 rats

B. The animals

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

In the literature no information is given on significant differences in food intake between the DJ-1, PINK1 and wildtype (WT) rats, therefore we will measure the baseline food intake levels in all 3 animal groups for 7 days.

For this study we will use adult wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats. The background strain of the DJ-1 and PINK1 KO rats is the Long Evans Hooded rat (from [REDACTED], so this strain is considered as wildtype. Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	own breeding	451	adult and pup

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 described study concerns with assessing the pharmacokinetics (PK) of KH176 *in vivo*, in order to design adequate dosing regimens for the behavioral and microdialysis studies. It is not possible to obtain the required pharmacokinetic information solely on the basis of *in vitro* studies.

Specific *in vivo* factors will have impact on the disposition of compounds, for which currently no adequate *in vitro* or *in silico* prediction tools are available and hence cannot be anticipated on without doing *in vivo* PK studies. Examples of such factors encompass perfusion of different organs, involvement of transporters and drug metabolizing enzymes for which no good *in vitro* systems are available (particularly to quantitatively account for differences in membrane expression of transport proteins/ drug metabolizing enzymes between the *in vitro* test systems and the *in vivo* situation).

Reduction:

Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study. We are using the absolute minimum number of animals necessary to still be able to discover potentially statistical significant differences between the various genotypes and/or treatment. Using even less animals leads to an increase of the standard error of mean (sem), thereby reducing the statistical power. By using selection criteria and go/ no go points in our dose selection study, the number of animals used in the behavioral and microdialysis studies will be reduced.

Refinement:

This study is necessary to optimize the dosing scheme and administration route of KH176, which will be used in the following long term treatment studies. To minimize the animals discomfort in the long term treatment studies, we are aiming on an oral administration via food pellets.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available. Animals will be group housed. Skilled personnel will perform the animal procedures. After administration, the animal's condition will be monitored until the end of the study. At the different time points animals will be sacrificed by performing a heart puncture under isoflurane anesthesia.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

non-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.

H. Pain and pain relief

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

Animals may experience pain during the administration of the compound. However, compound administration itself is not associated with a degree of pain that requires the use of analgesics. By using skilled personnel and previous handling of the animals, the discomfort will be minimized. At the end of the study the animals will be sacrificed by heart puncture under isoflurane anesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Possible types of discomfort occurring in this study:

- Stress (mild)
- Single injection causing pain and stress (mild)
- Administration of anesthesia (euthanization) (non-recovery)
- Discomfort due to the PD phenotype (mild)

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the handling of the animals and oral gavage.

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

To prevent stress, animals will be grouped housed during the study and previously handled. Administration of the compound will be carried out by experienced researchers. No side-effects/toxicity of KH176 are expected. No pharmacological induction of pain/toxicity was observed with KH176 in previous experiments (DEC 2013-210).

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.

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one of the following humane endpoints is reached:

- unexpected changes in the animal's behavior (e.g. no self-grooming or no food/water intake)
- animal response to a stimulus is decreased or changed

We do not expect humane endpoints due to the phenotype of the KO rats.

Indicate the likely incidence.

The animal procedures applied in this study are not expected to lead to a human endpoint.
Combined frequency: <2%

K. Classification of severity of procedures

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

The expected level of discomfort for all animals in this study is mild.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

At different time points the animals are sacrificed by bleeding via heart puncture, followed by cutting the diaphragm, which collapses the lungs, then immediately followed by removal of several tissues. All will be performed under anesthesia, so the animals will not experience discomfort. This is necessary to collect blood and tissues to measure the compound concentrations and to answer our research question.

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

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

| Yes _____

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Longterm-Behavioral study

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.

Animals used in this study (DJ-1, PINK1 and WT rats) will be bred. The genetically altered animals will have a PD phenotype, so the breeding will be considered with discomfort. In this behavioral study, we evaluate the therapeutic efficacy on different behavioral outcome measures. Behavioral tests chosen, are based on the literature, describing significant differences between the DJ-1, PINK1 KO rats and wildtype (WT) (Dave K.D. 2014). DJ-1 and PINK1 KO rat models display a significant reduction in rearing frequency in the open field compared to wildtype at the age of 6 and 8 months. Total distance traveled in the open field for PINK1 (not DJ-1) model was significantly impaired compared to wild type rats at 4, 6 and 8 months of age. Gait analysis revealed in both rat models at 4 and 8 months of age, a shorter duration in stride, swing and stance. Furthermore, number of both forelimb and hindlimb foot slips in the tapered balance beam test were significantly increased in PINK1, but not in DJ-1 KO rats at 6 and 8 months of age. Based on this phenotypic characterization, robust and specific behavioral dysfunctions are found in both rat models.

2) Behavioral study

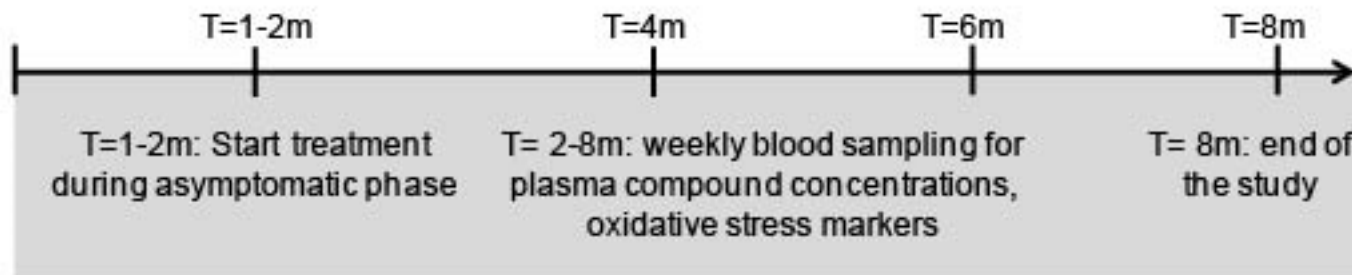


Open field (rearing frequency, total distanced traveled)

Gait analysis (duration in stride, swing and stance)

Tampered balance beam test (number of foot slips)

Behavioral analysis



Long-term treatment will start during the asymptomatic phase at the age of 1-2 months, and preferably administered via solid food pellets. To control for compound intake, body weight will be monitored daily and blood samples will be taken weekly to measure plasma concentrations and oxidative stress markers. A significant decrease in the body weight of an animal or an insufficient plasma concentration will lead to the exclusion of the animal from the study.

- outcome parameters:

- a) body weight (daily)
- b) plasma compound concentrations (weekly)
- c) oxidative stress markers in the blood (weekly)

The therapeutic effect of the compound will be assessed by different behavioral paradigms, performed at 4, 6 and 8 months of age.

- outcome parameters:

- a) mobility in open field (distance moved in cm)
- b) rearing frequency in open field
- c) gait abnormalities on catwalk (duration in stride, swing and stance)
- d) tapered balance beam performance (number of footslips)

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

The proposed procedures for this study are the following:

- 1) Breeding pairs of DJ-1^{-/-}, PINK1^{-/-} and Long Evans Hooded (LH) rats will be ordered by [REDACTED]. The LH rat is the background strain of the DJ-1 and PINK1 rats and considered as wildtype. For breeding, males and females will be paired, under normal housing conditions in our animal facility.
- 2) Long term treatment with the therapeutic compound starting at the age of 1-2 months until the age of 8 months. Preferably via food pellets.
- 3) If necessary compound administration via osmotic minipumps. Subcutaneous implantation of the osmotic minipump under gas isoflurane anesthesia (max 15 min).
- 4) Body weight will be checked daily (duration 1-2 minutes).
- 5) Blood samples will be taken weekly (duration 5-10 minutes).

6) Open field testing will be performed at the age of 4, 6 and 8 months. At each time point, after habituation to the testing room, animals will be tested for 1 hour sessions. The same protocol will be used as described in the literature (Dave K.D. 2014).

7) Gait analysis will be performed using the catwalk at the age of 4, 6 and 8 months. At each time point, after habituation to the testing room, 5 min sessions will be performed. The same protocol will be used as described in the literature (Dave K.D. 2014).

8) Tampered balance beam test will be performed at the age of 4, 6 and 8 months. At each time point, after habituation to the testing room, testing of 3 consecutive runs will be performed. The same protocol will be used as described in the literature (Dave K.D. 2014).

9) At the age of 8 months the animals will be sacrificed.

All behavioral testing will always be performed in the same order, to prevent any effects of one test on the other. Per day only one test will be performed, with resting days (no test) in between.

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

Before this behavioral study, the dose selection study is performed using selection criteria and go/ no go points.

Primary outcome of this study are the behavioral outcome parameters. [REDACTED] and the literature (Dave et al. 2014) we estimate the group size on 15 animals. Currently, two genetic rat models for Parkinson's Disease (PD) are well defined and available (DJ-1 and PINK1 KO rats). For each study, a control wildtype group will be included.

Total group size 15 X genotypes 3 X treatment groups 2 = 90 animals (30 per animal group)

Breeding information for each animal group:

Mean number of 8 pups per litter

Ratio male/female is 50/50

Breeding success of 80%

DJ-1: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups

To be registered: 14 DJ-1 breeding animals + 40 pups = 54 rats

PINK1: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups

To be registered: 14 PINK1 breeding animals + 40 pups = 54 rats

WT: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups
To be registered: 30 pups used in the experiment.

Grand total: 54 DJ-1 + 54 PINK1 + 30 WT rats = 138 rats

B. The animals

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

Recently, novel rat knockout (KO) models of DJ-1 and PINK1 genes were generated and characterized (1-4). In contrast to mice, the loss of either DJ-1 gene or PINK1 gene in rats result in a marked behavioral dysfunction and significant loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, both major characteristics of Parkinson's Disease (PD). These findings support the use of the DJ-1 and PINK1 KO rat models as relevant animal models for the evaluation of novel therapeutic strategies for PD.

Based on the literature, it is known that the PD symptoms occur in DJ-1 and PINK1 KO rat models between the age of 4 and 8 months. We hypothesize that KH176 will act as a neuroprotective agent by restoring or preventing the cellular redox imbalance, particularly in dopaminergic neurons, and ultimately prevent and/or delay the manifestation of PD. Therefore, we would like to start the treatment in the asymptomatic phase (1-2 months of age).

The background strain of the DJ-1 and PINK1 KO rats is the Long Evans Hooded rat (from [REDACTED]), so this strain is considered as wildtype. Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	own breeding	138	adult and pup

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 project we are evaluating the therapeutic effect of KH176 for the treatment of Parkinson's Disease (PD). Therefore, it is necessary to use relevant animal models that are showing marked clinical PD symptoms (such as loss of dopaminergic neurons, motor impairments). Currently, DJ-1 and PINK1 rat models are the best commercially available animal models for PD.

Reduction:

Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study. We are using the absolute minimum number of animals necessary to still be able to discover potentially statistical significant differences between the various genotypes and/or treatments. Using even less animals leads to an increase of the standard error of mean (sem), thereby reducing the statistical power. Within one batch, all three genotypes (DJ-1, PINK1 and WT) will be included to reduce the number of control animals. By using selection criteria and go/ no go points in our dose selection study, the number of animals used in the behavioral and microdialysis studies will be reduced.

Refinement:

To minimize the animals discomfort in the long term treatment studies, we are aiming on an oral administration via food pellets. Furthermore, the measurements for behavior are non invasive with relative minimal discomfort for the animals.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Animals are group housed. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available. The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

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.

non-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.

If KH176 will be administrated via osmotic minipumps instead of oral administration via food pellets, animals may experience pain and discomfort due to the subcutaneous implantation of the osmotic minipump under isoflurane anesthesia. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. After surgery, rats will be treated with Flunixin (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available. To prevent stress, animals will be grouped housed during the study. Behavioral testing will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies. No side-effects of the compound are expected. No pharmacological induction of pain/toxicity was observed by KH176 in previous experiments (DEC 2013-210).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress (mild)
- Discomfort due to toxicity of treatment (mild)
- Implantation of osmotic minipump (moderate)
- Blood sampling causing pain and stress (mild)
- Discomfort due to the PD phenotype (mild)

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the handling of the animals and other experimental procedures such as implantation of osmotic minipumps, behavioral testing and blood sampling.

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

Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again. No side-effects of the compounds are expected. No pharmacological induction of pain/toxicity was observed by KH176 in previous experiments (DEC 2013-210). By using skilled personnel and previous handling of the animals, the discomfort will be minimized during blood sampling and behavioral testing.

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.

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- 15% weight loss in less than 2 days
- a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment
- unexpected changes in the animal's behavior (e.g. no self-grooming or no water intake), or when the animal response to a stimulus is decreased or changed.
- when the body weight after surgery stays below 85% of the pre-surgery weight for 3 consecutive days

We do not expect humane endpoints due to the phenotype of the KO rats.

Indicate the likely incidence.

The knock-out phenotype is not expected to lead to a human endpoint.

Furthermore, the animal procedures applied in this behavioral study are not expected to lead to a human endpoint.

Combined frequency: <2%

K. Classification of severity of procedures

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

The expected level of discomfort for all animals in this study is moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

This is necessary to collect blood and tissues for further *ex vivo* measurements to answer our research question.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3 List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 3	Type of animal procedure Longterm treatment-Microdialysis study

2 Description of animal procedures

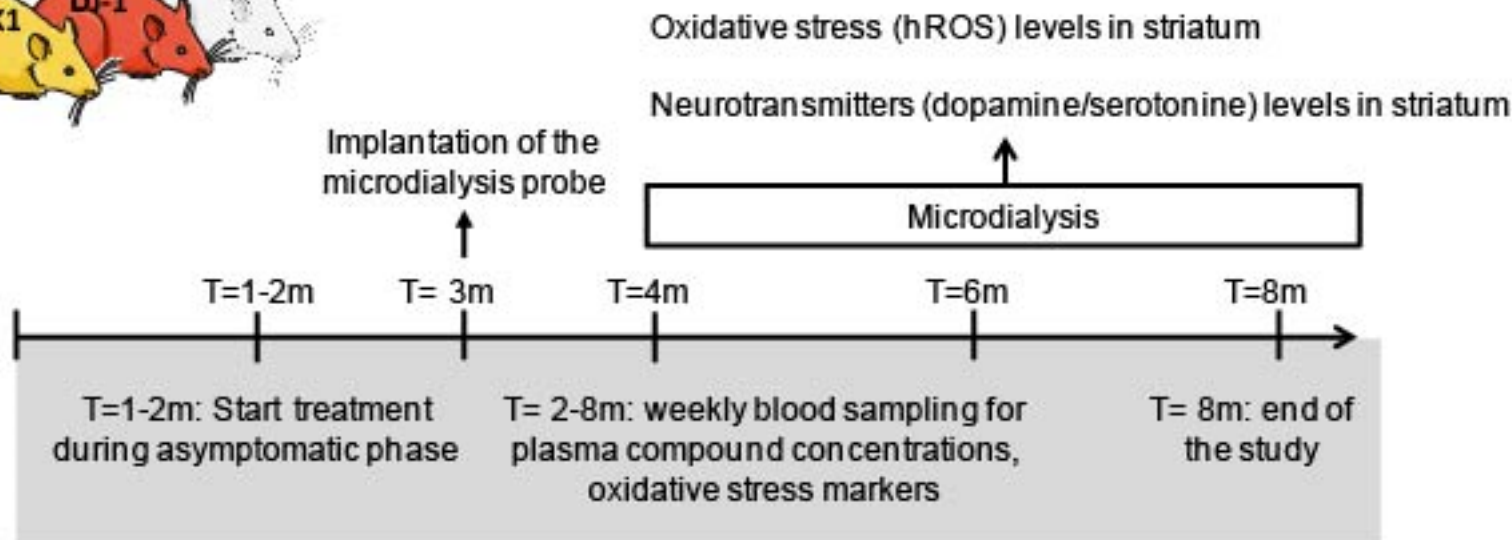
A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Animals used in this study (DJ-1, PINK1 and WT rats) will be bred. The genetically altered animals will have a PD phenotype, so the breeding will be considered with discomfort. In this microdialysis study, we evaluate the therapeutic effect on neurotransmitter levels and oxidative stress (hROS) in the brain.

Based on the literature, we know that there is a significant 2-3 fold increase in striatal dopamine and serotonin level in both DJ-1 and PINK1 KO rats compared to wild type at 8 months of age (Dave K.D. 2014). To date, no information is known on the oxidative stress (hROS) levels in the brain of DJ-1 and PINK1 KO rats.

3) Microdialysis study



Long-term treatment will start during the asymptomatic phase at the age of 1-2 months, and preferably administered via solid food pellets. To control for compound intake, body weight will be monitored daily and blood samples will be taken weekly to measure plasma concentrations and oxidative stress markers. A significant decrease in the body weight of an animal or an insufficient plasma concentration will lead to the exclusion of the animal from the study.

- outcome parameters:

- a) body weight (daily)
- b) plasma compound concentrations (weekly)
- c) oxidative stress markers in the blood (weekly)

The therapeutic effect of the compound will be assessed by microdialysis, performed at 4, 6 and 8 months of age.

- outcome parameters:

- a) oxidative stress (hROS) levels
- b) neurotransmitter (dopamine and serotonin) levels

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

The proposed procedures for this study are the following:

- 1) Breeding pairs of DJ-1^{-/-}, PINK1^{-/-} and Long Evans Hooded (LH) rats will be ordered by [REDACTED]. The LH rat is the background strain of the DJ-1 and PINK1 rats and considered as wildtype. For breeding, males and females will be paired, under normal housing conditions in our animal facility.
- 2) Long term treatment starting at the age of 1-2 months until the age of 8 months. Preferably via food pellets. If necessary via osmotic minipumps.
- 3) If necessary compound administration via osmotic minipumps. Subcutaneous implantation of the osmotic minipump under gas isoflurane anesthesia (max 15 min).
- 4) Body weight will be checked daily (duration 1-2 minutes).
- 5) Blood samples will be taken weekly (duration 5-10 minutes).
- 6) Stereotactic surgery will be performed at the age of 3 months. Animals will be implanted with a guide cannula in the brain (surgery time approximately 45-60 minutes).
- 7) Microdialysis will be performed at 4, 6 and 8 months of age (duration maximal 8 hours).

8) At the age of 8 months the animals will be sacrificed.

We propose to perform microdialysis because it is a reliable, sensitive, and relatively easy technique to directly measure changes in the extracellular neurotransmitter and oxidative stress levels in the brain. The advantage of the suggested technique above other techniques, like for instance immunohistochemistry, is that one doesn't need to sacrifice a large number of animals to measure the changes over time. In addition, measurements can be performed in freely moving animals. Compared to electronmicroscopy, our technique is faster, more sensitive, cheaper and, most importantly, more quantitative. The suggested procedures are based on previous experience [1]. For the measurement of oxidative stress, the suggested procedure has been recently described and validated by Misini et al. and others [2-4].

[REDACTED]

[REDACTED]

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

Primary outcome of this study are the neurotransmitter levels in the brain. Based on the [REDACTED] group size is estimated on 12 animals. We would like to perform microdialysis in the same animals at three different time points (4, 6 and 8 months of age). Per group 3 rats have been added to compensate for the animals that have to be excluded because of incorrect placement of the microdialysis probe or possible loss of the canula. So total estimated group size is 15 animals.

Currently, two genetic rat models for Parkinson's Disease (PD) are well defined and available (DJ-1 and PINK1 KO rats). For each study, a control wild type group will be included.

Total group size 15 X genotypes 3 X treatment groups 2 = 90 animals (30 per animal group)

Breeding information for each animal group:

Mean number of 8 pups per litter

Ratio male/female is 50/50

Breeding success of 80%

DJ-1: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups
To be registered: 14 DJ-1 breeding animals + 40 pups = 54 rats

PINK1: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups
To be registered: 14 PINK1 breeding animals + 40 pups = 54 rats

WT: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups
To be registered: 30 pups used in the experiment.

Grand total: 54 DJ-1 + 54 PINK1 + 30 WT rats = 138 rats

B. The animals

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

Recently, novel rat knockout (KO) models of DJ-1 and PINK1 genes were generated and characterized (5-8). In contrast to mice, the loss of either DJ-1 gene or PINK1 gene in rats result in a marked behavioral dysfunction and significant loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, a major characteristic of Parkinson's Disease (PD). These findings support the use of the DJ-1 and PINK1 KO rat models as relevant animal models for the evaluation of novel therapeutic strategies for PD. These two genetic rat models are commercially available at Sage Labs.

Based on the literature, it is known that the PD symptoms occur between the age of 4 and 8 months. We hypothesize that KH176 will act as a neuroprotective agent by restoring or preventing the cellular redox imbalance, particularly in dopaminergic neurons, and ultimately prevent and/or delay the manifestation of PD. Therefore, we would like to start the treatment in the asymptomatic phase (1-2 months of age).

The background strain of the DJ-1 and PINK1 KO rats is the Long Evans Hooded rat (from Charles River Laboratories), so this strain is considered as wildtype. Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study.

5. Dave KD, De Silva S, Sheth NP, Ramboz S, Beck MJ, Quang C, et al. Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*. 2014;70:190-203.
6. Sun J, Kouranova E, Cui X, Mach RH, Xu J. Regulation of dopamine presynaptic markers and receptors in the striatum of DJ-1 and Pink1 knockout rats. *Neuroscience letters*. 2013;557 Pt B:123-8.
7. Baptista MA, Dave KD, Sheth NP, De Silva SN, Carlson KM, Aziz YN, et al. A strategy for the generation, characterization and distribution of animal models by The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research. *Disease models & mechanisms*. 2013;6(6):1316-24.
8. Villeneuve LM, Purnell PR, Boska MD, Fox HS. Early Expression of Parkinson's Disease-Related Mitochondrial Abnormalities in PINK1 Knockout Rats. *Molecular neurobiology*. 2014.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	own breeding	138	adult and pup

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 project we are evaluating the therapeutic effect of KH176 for the treatment of Parkinson's Disease (PD). Therefore, it is necessary to use relevant animal models that are showing marked clinical PD symptoms (such as loss of dopaminergic neurons, motor impairments). Currently, DJ-1 and PINK1 rat models are the best commercially available animal models for PD.

Lower animals cannot be used because there is no microdialysis equipment available (invertebrates) or the surgery procedures are relatively complicated (mice) leading to an unacceptable high exclusion of animals (i.e. mice in which the position of the probe or punch was wrong). Cell-lines cannot be used

because we need link neurochemical changes to changes in behavior. Previous studies shows that in rats microdialysis is relatively easy to perform, resulting in reliable results.

Reduction:

Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study. We are using the absolute minimum number of animals necessary to still be able to discover potentially statistical significant differences between the various genotypes and/or treatment. Using even less animals leads to an increase of the standard error of mean (sem), thereby reducing the statistical power. By using selection criteria and go/ no go points in our dose selection study, the number of animals used in the behavioral and microdialysis studies will be reduced. Within one batch, all three genotypes (DJ-1, PINK1 and WT) will be included to reduce the number of control animals.

Refinement:

To minimize the animals discomfort in the long term treatment studies, we are aiming on an oral administration via food pellets.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available. The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the periosteum and the skin of the head. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused, small breaks are taken after the surgery of every two rats and no more than 8 rats will undergo surgery per day. After surgery, rats will be treated with Flunixin (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis.

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.

non-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 discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the periosteum and the skin of the head. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused, small breaks are taken after the surgery of every two rats and no more than 8 rats will undergo surgery per day. After surgery, rats will be treated with Flunixin (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress (mild)
- Discomfort due to toxicity of treatment (mild)
- Implantation of osmotic minipump (moderate)
- Blood sampling causing pain and stress (mild)
- Discomfort due to the PD phenotype (mild)
- Discomfort due to recovery of surgery (moderate)

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the handling of the animals and other experimental procedures such as surgery, microdialysis and blood sampling.

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

Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again.

No side-effects of the compounds are expected. No pharmacological induction of pain/toxicity was observed by KH176 in previous experiments (DEC 2013-210).

By using skilled personnel and previous handling of the animals, the discomfort will be minimized during blood sampling.

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.

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- 15% weight loss in less than 2 days
- a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment
- unexpected changes in the animal's behavior (e.g. no self-grooming or no water intake), or when the animal response to a stimulus is decreased or changed.
- if the animal loses its cannula
- when the body weight after surgery stays below 85% of the pre-surgery weight for 3 consecutive days

We do not expect humane endpoints due to the phenotype of the KO rats.

Indicate the likely incidence.

Previous microdialysis studies have shown that less than 5% of the animals reach their humane endpoint.

K. Classification of severity of procedures

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

The expected level of discomfort for all animals in this study is moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No

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

This is necessary to collect blood and tissues for further *ex vivo* measurements to answer our research question.

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

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

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0132
2. Titel van het project: Evaluation of potential disease modifying therapeutics for Parkinson's Disease
3. Titel van de NTS: Het evalueren van potentieel nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van Parkinson
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 24-11-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 01-12-2015 en 05-01-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-12-2015 tot 22-12-2015 en van 13-01-2016 tot 14-01-2016
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-12-2015 en 14-01-2016
 - advies aan CCD: 09-02-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-12-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Niet-technische samenvatting:**
 - 3.5 De gegeven percentages van het totaal aantal dieren zijn bij elkaar opgeteld slechts 95% van de dieren. De commissie betwijfelt of het ongerief voor de dieren in experiment 2 matig is (zie de vragen over DAP2).
 - 4.3 De keuze voor de diersoort is nog niet verklaard. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.

Project Proposal:

- 3.1 De omschrijving van de te testen compounds (met name de vier die op dit moment nog niet bekend zijn) en de criteria voor het onderzoeken van deze compounds zijn onvoldoende om een ethische afweging te kunnen maken. Wanneer KH176 de gewenste werking heeft, willen de onderzoekers dan nog steeds vier andere compounds testen? Wat is het werkingsmechanisme van KH176 op grond waarvan de onderzoekers positieve resultaten verwachten bij toepassing voor de ziekte van Parkinson? Wat is het verschil in werking met de reeds in clinical trials geteste stoffen? Op welke manier onderscheidt deze stof zich van andere ROS-scavengers?

De vermelding hier en in andere delen van de projectaanvraag dat 'the four other compounds will be defined later on' is de enige informatie welke gegeven wordt om 4/5 van het totaal aantal gevraagde dieren te rechtvaardigen. Indien de onderzoekers niet elk van deze verbindingen benoemen en een duidelijke omschrijving van bijvoorbeeld werkingsmechanisme en toxiciteit kunnen geven is een afweging van het belang van het testen van die verbindingen afgezet tegen het ongerief van de dieren voor de commissie onmogelijk te maken. In dit geval verzoekt de commissie de aanvraag alleen voor KH176 te schrijven.

- 3.1 Verlies van dopaminerge neuronen in de substantia nigra is niet het enige kenmerk van de ziekte van Parkinson. De onderzoekers worden verzocht iets meer aandacht te besteden aan de relevantie van het gekozen KO model voor de humane ziekte.

- 3.1 Wat zijn de verschillen en overeenkomsten tussen de twee genoemde transgene modellen, en komt die overeen met onderverdeling in patiëntengroepen?

- 3.2 De onderzoekers worden verzocht de (binnen vijf jaar) haalbare hoofddoelstelling van het project bondiger te omschrijven. De commissie meent dat het verkrijgen van extra informatie over de rattenmodellen geen doelstelling is, maar een spin-off van het onderzoek.

- 3.4.2 De onderzoekers worden verzocht te verwijzen naar bijlage 3 van de animal procedures in plaats van naar de tab in iVentionLES. De commissie en de CCD beoordelen de aanvraag op basis van alleen de pdf.

- 3.4.2 De onderzoekers willen de farmacokinetiek alleen in wt dieren onderzoeken. De commissie meent dat het verstandig is om te controleren of de farmacokinetiek in de KO dieren exact hetzelfde is.

Description of Animal Procedures:

DAP1

-1.3 De titel is alleen van toepassing op de farmacokinetiek en niet op het pilotexperiment dat daarna volgt.

- A2: Kunnen de onderzoekers toelichten hoe zij de turn-over van deze stof hebben betrokken bij de keuze voor de vijf tijdstippen?

- A3: De figuur op pagina 4 is onleesbaar.

- I/K: De onderzoekers worden verzocht het ongerief niet als cijfercode maar als woord te vermelden. Het ongerief van een handeling onder een narcose waaruit het dier niet meer bijkomt is terminaal.

- J: De onderzoekers worden verzocht de omschrijving van het tweede humane eindpunt aan te passen. Indien een dier helemaal niet meer op prikkels reageert is het namelijk te laat voor een humaan eindpunt.

-K: zie vraag over onderdeel I.

DAP2

-A2/K: Indien de stof niet via de voeding kan worden gegeven, zullen de dieren gedurende maximaal 7 maanden dagelijkse injecties met de stof krijgen. De commissie meent dat dit vermijdbaar ongerief voor de dieren veroorzaakt, aangezien er alternatieve toedieningsvormen bestaan zoals minipompjes die dagelijkse injecties kunnen vervangen. Het is dan ook onwaarschijnlijk dat de commissie de CCD zal adviseren bijvoorbeeld een dagelijkse i.p. injectie gedurende zeven maanden toe te staan. Dierproeven die met minder ongerief uitgevoerd kunnen worden zijn bij wet niet toegestaan.

-I: Wat is het verwachte ongerief van de behandeling met de compound? Bij I1 wordt dit ingeschaald als matig, terwijl er bij I3 wordt vermeld dat er geen bijwerkingen in de vorm van pijn of toxiciteit worden verwacht van de compound. Ligt een inschaling als licht ongerief als gevolg van de toediening niet meer voor de hand? Dagelijkse injecties gedurende langere tijd geven inderdaad matig ongerief, maar zijn niet toegestaan indien er alternatieven met minder ongerief voor handen zijn.

-I: Wat is het ongerief van de KO muizen? Bij I1 is dit ingeschaald als licht, bij onderdeel J kan het een HEP zijn. De onderzoekers worden verzocht dit duidelijker uit te leggen

DAP3

-I1: het ongerief als gevolg van een operatie is in elk geval matig.

- Datum antwoord: 22-12-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-3.5: De percentages zijn aangepast. Het ongerief voor experiment 1 en 2 zijn ingeschaald op mild en experiment 3 op matig.

-4.3: De keuze van de diersoort is toegevoegd.

Project Proposal:

-3.1: Het aantal te testen stoffen is gereduceerd naar alleen KH176. Er is meer informatie toegevoegd over het werkingsmechanisme van KH176. Het is belangrijk dat deze informatie patentgevoelig is en dus vertrouwelijk.

-3.1: Wij zijn ons ervan bewust dat het verlies van dopaminerge neuronen niet het enige kenmerk van de ziekte van Parkinson (PD) is. Een uitgebreidere beschrijving van het phenotype van de DJ-1 en PINK1 KO ratten is toegevoegd om de relevantie van deze diermodellen te benadrukken.

-3.1: De verschillen en overeenkomsten tussen de DJ-1 en PINK1 KO ratten en de relatie tot PD patiënten, op basis van de tot nu toe beschikbare data, zijn toegevoegd. Er is nog maar beperkt informatie beschikbaar over de neuropathologie van de twee specifieke patiëntgroepen.

-3.2: Hoofddoelstelling is bondiger opgeschreven.

-3.4.2: De verwijzing is aangepast.

-3.4.2: Het is inderdaad correct dat de farmacokinetiek anders kan zijn in de KO ratten. We zullen de farmacokinetiek nu in alle 3 de diergroepen uitvoeren. Het figuur is hier ook aangepast.

Description of Animal Procedures:

DAP1

-1.3: De titel is gewijzigd naar “dose selection study”.

-A2: Op basis van eerdere farmacokinetiek studies met KH176 in rat en muis weten we dat 5 tijdstippen genoeg zijn om een betrouwbare curve te maken en de halfwaardetijd van de stof te bepalen. Hiermee beperken we het aantal benodigde dieren

-A3: De figuur is aangepast. Verder zijn de aantallen dieren aangepast.

-I/K: Het ongerief is als woord vermeld.

-J: Het tweede humane eindpunt is aangepast.

DAP2

-A2/K: Alternatieve toedieningsvorm is veranderd naar osmotische minipomp.

-I: Ongerief van de behandeling met KH176 is nu ingeschaald op mild.

-I: Het ongerief van het fenotype van de KO ratten is inderdaad ingeschaald op mild en daarom is deze nu ook weggehaald bij onderdeel J HEP.

DAP3

-I1: het ongerief voor de operatie is nu ingeschaald op matig.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum:13-01-2016

- Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-3.2 De tekst over de haalbaarheid van de projectaanvraag is weggefallen. De commissie verzoekt de onderzoekers deze weer op te nemen.

Description of Animal Procedures:

-DAP2 en DAP3, onderdeel I: het ongerief van het plaatsen van een mini-pomp is matig i.p.v. licht. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen in deze bijlagen met dierproeven en in de niet-technische samenvatting punt 3.5.

- Datum antwoord: 14-01-2016

- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-3.2 De tekst over de haalbaarheid is toegevoegd.

Description of Animal Procedures:

-Het ongerief van het plaatsen van de mini-pompjes is veranderd naar matig in DAP2 en DAP3 bij onderdeel I. De classificatie van DAP2 is nu veranderd naar matig ook in de technische samenvatting.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum antwoord: 14-01-2016

- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

3.2 De tekst over de haalbaarheid is toegevoegd.

Description of Animal Procedures:

- Het ongerief van het plaatsen van de mini-pompjes is veranderd naar matig in DAP2 en DAP3 bij onderdeel I. De classificatie van DAP2 is nu veranderd naar mild ook in de technische samenvatting.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to evaluate the therapeutic potential of KH176, a new chemical entity, on Parkinson's Disease (PD) phenotype in PD animal models.' De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken of toediening van KH176 leidt tot therapeutische concentraties in de hersenen van ratten, en of KH176 een therapeutisch effect heeft in de gekozen diermodellen voor de ziekte van Parkinson. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapieën voor mensen met de ziekte van Parkinson. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang omdat deze progressieve neurologische ziekte in onze vergrijzende samenleving steeds vaker voorkomt. Op dit moment is genezing niet mogelijk. De symptomen van de ziekte kunnen enigszins bestreden worden met medicatie. De DEC acht dit onderzoek met een potentieel nieuwe medicijn voor de ziekte van Parkinson van substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het effect in KO-ratten van KH176 op gedrag en op neurotransmitter concentraties en oxidatieve stress in de hersenen. Voorts wordt duidelijk of dit middel mogelijk oraal kan worden ingenomen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door het tijdens een operatie implanteren van een canule

in de hersenen of door het subcutaan implanteren van een mini-pompje bij een deel van de dieren. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde wekelijkse bloedafnames, de fok van de KO ratten, het meten van de voedselinname gedurende 7 dagen, de orale gavage, de gedragstesten, en de hartpunctie onder terminale anesthesie in als licht. Het ongerief als gevolg van de operatie waarin een osmotische minipomp onder de huid wordt geplaatst of een canule in bepaalde hersengebieden wordt aangebracht schat de commissie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 62% van de dieren, en matig voor 38% van de dieren indien KH176 niet via het voedsel kan worden toegediend.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Farmacokinetiek van een stof kan niet in vitro bepaald worden. Een hersenziekte met consequenties voor het gedrag kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolgexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 727 ratten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Er wordt eerst een pilot experiment gedaan om te bepalen of de stof oraal gegeven kan worden door toevoeging aan het voer. Indien dit niet mogelijk blijkt zullen osmotische minipompjes geïmplant worden om te voorkomen dat de dieren gedurende langere tijd dagelijks i.p. of s.c injecties zouden krijgen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

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

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de mogelijke toedieningsvorm en therapeutische effecten van KH176 bij ratten die model staan voor de ziekte van Parkinson. Bij positieve resultaten zullen deze kunnen leiden tot het ontwikkelen van nieuwe medicijnen voor mensen met de ziekte van Parkinson. Het belang van meer inzicht in het werkingsmechanisme van KH176 en het beschikbaar komen van nieuwe interventies voor de ziekte van Parkinson acht de DEC substantieel, gezien de toenemende prevalentie van deze ongeneeslijke neuron degeneratieve ziekte in de bevolking.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 62% van de dieren licht ongerief en maximaal 38% van de dieren alle matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de operaties in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

E. Advies

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002016418

Bijlagen

2

Datum 9 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 9 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016418. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, t.a.v. [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 9 maart 2016
Geplande einddatum: 9 maart 2021
Titel project: Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease
Titel niet-technische samenvatting: Het evalueren van een potentieel nieuw geneesmiddel voor de behandeling van Parkinso
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1441,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

9 februari 2016



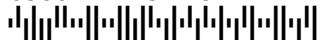
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002016418

Bijlagen

2

Datum 9 februari 2016


Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 9 februari 2016

Vervaldatum: 10 maart 2016

Factuurnummer: 16700418

Ordernummer: 040823-461220 / 2015-0132 / 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016418	€

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS0569996317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

[Redacted address]

Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN
[Barcode]

**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
AVD103002016418
Bijlagen
1

Datum 14 maart 2016
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 9 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease" met aanvraagnummer AVD103002016418. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 maart 2016 tot en met 9 maart 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 9 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, aangevuld met de twee algemene voorwaarden zoals hierboven gemotiveerd.

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

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven



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
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 maart 2016 tot en met 9 maart 2021, voor het project "Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease" met aanvraagnummer AVD103002016418, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 februari 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 februari 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 februari 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 februari 2016, ontvangen op 10 februari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Dose selection study	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / WT; DJ-1; PINK1; beide geslachten	451	Licht	Fokken met ongerief.
Longterm-Behavioral study	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Gelijk aan dierproef 1.	138	Matig	Fokken met ongerief.
Longterm treatment-Microdialysis study	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Gelijk aan dierproef 1.	138	Matig	Fokken met ongerief.

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

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

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IVD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 14 maart 2016 15:05
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven
Bijlagen: Beslissing projectvergunning dierproeven AVD103002016418.pdf

Geachte heer/mevrouw,

Vriendelijk verwijs ik u naar de brief en de bijlagen.


Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag



Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 14 maart 2016 15:08
Aan: 
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD103002016418

Geachte RU DEC,

Op 09-02-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease' met aanvraagnummer AVD103002016418.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

De CCD heeft besloten de vergunning te verlenen, onder de volgende algemene voorwaarden:

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

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, daar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

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