

**10.2 .e. en g** We furthermore have access to the necessary neuroimaging facilities and behavioral equipment and have the required experience to perform neuroimaging and behavioural studies. Considering the above-mentioned experience, we believe that our objective is achievable in the 5 years requested for this project. The 3R's are always taken into account by our group by carefully practicing, planning and optimizing the experimental procedures with the aim to use as few animals as possible, and to cause the animals as little discomfort as possible. In addition, all studies that are performed by our group are conducted and reports in compliance with the ARRIVE and STRIVE guidelines.

**Obesity studies by our group:**

**10.2 .e. en g**

[Redacted]

**Stroke studies performed by our group:**

**10.2 .e. en g**

[Redacted]

**3.3 Relevance**

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

Social: Stroke affects millions of people worldwide and places a considerable burden on society. The clinical outcome after an ischemic stroke is often severe, since stroke survivors suffer from gradual, but continuous cognitive and behavioral dysfunction and treatments are not available except for thrombolysis being effective within a very small therapeutic time window after ischemic stroke. In all, but especially in obese patients, no effective treatment strategies for ischemic stroke are available since classical treatment strategies were shown to be less effective. Therefore, it is necessary to further investigate alternative treatments to counteract the disturbing effects of stroke on cerebral (functional) connectivity, blood flow, motor function, and cognition. It is crucial to understand the mechanisms and the physio-pathological interaction of both pathologies (stroke and obesity) that leads to the motor and cognitive impairments after a stroke in order to reach the goal of the best and the safest therapeutic strategy. Till now, voluntary

exercise has only been investigated as a treatment option for obesity or stroke independently, but the combination of both diseases has been neglected so far. Furthermore, we will investigate stroke in obesity for the first time longitudinally. Therefore, by understanding the underlying pathological mechanisms of stroke and obesity on the brain as well as the efficacy of exercise as a novel treatment approach, it may improve treatment outcome for a large group of obese stroke patients.

**Scientific:** A void of understanding persists regarding the interaction of stroke in obese patients. While human studies report contradicting results regarding the severity of stroke in obese patients (obesity paradox), animal studies clearly show that stroke in combination with obesity results in more severe stroke outcome. Investigating the interaction of both disease as well as the impact of exercise as intervention on neuroimaging parameters, cognition and behaviour we will get more insight into the exact underlying pathological mechanisms. We will assess the effect of stroke in obese animals not only acute, but we will also follow up the animals for about 5 months after stroke, which was never done before. At the same time, we will also investigate what effects exercise has on the recovery after stroke. This in turn might identify other novel therapeutic and/or diagnostic targets.

### 3.4 Research Strategy

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



**Figure 1** Flow-chart of experimental procedures. First, a training group of animals (n=15) will be used to practice and optimize relevant procedures, such as the stroke induction and MRI scans, leading to refinement and reduction. The estimated mortality in the training group is between 35% and 40%. After the training group, we will continue with the main experiment, using only male [10.1 c en 10.2 g](#) mice. In this main experiment we will induce a go-/no-go moment: if the mortality of the first cohort of the main study (n=24 animals) is exceeding our estimated mortality, we will not proceed with the study (sham=25% mortality, stroke=35% mortality). We will perform the same main experiment in female mice, if the effects in male mice are in line with our hypothesis (go/no-go moment).

#### Main experiment (male mice):

For the present study we decided to use [10.1 c en 10.2 g](#) mice because of its adiposity mimicking features when exposed to a diet containing high levels of fat and/or sucrose, such as hyperlipidemia. Secondly, [10.1 c en 10.2 g](#) mice develop cardiovascular risk factors often found in obese individuals, including hypertension, hyperlipidemia, hypercholesterolemia, increased body weight, and atherosclerosis, which are risk factors for stroke. [10.2 e en g](#) male mice will be transported from [10.2 g](#) where they will receive high fat diet (HFD) to develop obesity (weight is checked weekly). At first, we will be using male [10.1 c en 10.2 g](#) mice to avoid the confounding effects of ovarian hormones in female mice that have been extensively reported to exert powerful vascular effects. In case we see exercise-induced improvements during recovery in male, obese stroke mice, the same experiment will be repeated in female mice. After at least 6 weeks

on HFD, baseline physiological and behavioral tests will be performed before experimental stroke induction (e.g. systolic blood pressure (SBP), Morris water maze (MWM), grip test, open field, pole test). At approximately 3,5 months of age, and after 6 weeks on high-fat diet, the animals will be randomly subjected to either a transient middle cerebral artery occlusion to mimic an ischemic stroke or a sham surgery. Immediately after experimental stroke, sham/stroke animals will be randomly assigned into two different treatment groups: voluntary exercise vs sedentary. We will install running wheels into the homecage of half of the animals to investigate voluntary exercise as possible treatment after experimental stroke in obese mice. The sedentary mice (control) will have a blocked running wheel inside their cages. All animals are housed in [10.1 c en 10.2 g](#) which is monitoring the activity of animals 24/7. Thus, we will have in total 4 experimental groups:

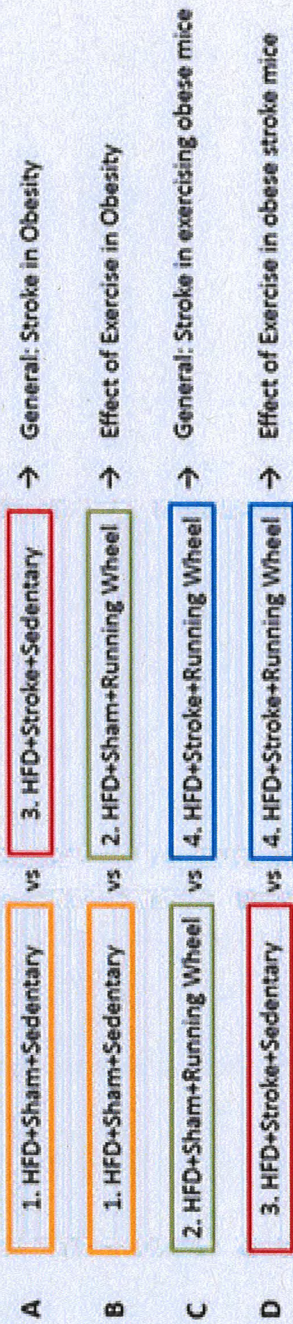
#### **Study groups:**

1. HFD + sham + Sedentary: metabolic overload, no stroke induction, no intervention.
2. HFD + sham + Exercise: A metabolic phenotype is induced with energy-dense diets as in group 1. to establish a situation of metabolic overload on metabolism and brain. Mice receive also an intervention (exercise) with possible beneficial health effects to counteract obesity related symptoms.
3. HFD + stroke + Sedentary: A metabolic phenotype induced by treatment with an energy-dense high caloric diet in combination with stroke induction. This animal model shows the phenotype of both disease without receiving an intervention.
4. HFD + stroke + Exercise: A metabolic phenotype is induced with energy-dense diets in combination with stroke induction (as in group 3.), but mice will receive intervention (exercise) with possible beneficial health effects to counteract obesity and stroke related symptoms.

After the tMCAo/sham occlusion, all animals (stroke, sham) will be kept individually housed to optimize healing of the surgical wounds and better monitor physiological parameters (food intake etc.) and stroke-related abnormalities (e.g. abnormal motor function). Monitoring food and water intake for each mouse can also help us to better define humane endpoints, but it is also an important parameter in this diet study, where we investigate the effect of HFD on stroke. Also, exercise should be assessed for each mouse individually to be able to see if voluntary running has beneficial effects on stroke recovery. Thereby are the animals housed in the so-called [10.1 c en 10.2 g](#) in which 24/7 every 1/4 second activity and walking patterns are monitored via sensors in the bottom of the cage which is of utmost relevance in stroke research to monitor recovery of movement without causing stress/discomfort by measuring this in separate tests outside their home cage. Per [10.1 c en 10.2 g](#) it is only possible to place one running wheel (right side of the cage). That makes it impossible in our experiment to place dividers into the cage, since all animals need to have access to a (blocked) running wheel. However, the animals can see and hear (ultrasound) each other, because the cages are placed next to each other in the same rack. All animals are followed up for 6 months and repetitive behavioral, motor, and cognitive tests are necessary to monitor stroke recovery on short-, mid- and long-term. After the last MRI scan (under anaesthesia), animals will be sacrificed and organs/tissue (e.g. brain, muscles) for postmortem experiments will be collected. Our primary outcome measure are the MRI scans which enables us to measure the consequences of stroke induction on brain function and connectivity as well as the treatment effects of voluntary wheel running. Secondary outcome measures are the behavioral, motor and cognitive tests which will be correlated to the imaging parameters. After the experiments using 64 male mice to test the effect of voluntary exercise on stroke, a go/no-moment is introduced. Only if significant effects of voluntary wheel running are observed in male mice, voluntary wheel running will also be tested after an experimental stroke in 64 female [10.1 c en 10.2 g](#). The exact and expected research outcome as well as research questions that can be answered are as following:

**Research outcome:**

In the figure 2 it is visualized what research question we can answer by comparing the different assessed parameters of different groups. Our main research question can be answered by comparing HFD+Stroke+Sedentary with HFD+Stroke+Running Wheel. Based on that comparison we can draw conclusion if (brain) recovery promoted by voluntary exercise in stroke operated obese animals.



**Figure 2.** Research outcome by comparing different experimental groups.

A. By comparing group 1 with group 3 it is possible to study the general effects of stroke in an obese phenotype, and the underlying pathological mechanisms of stroke and obesity without taking interventions into consideration.

B. By comparing group 1 with group 2 it is possible to study the general efficacy of exercise against adverse effects of obesity. Exercise as intervention against metabolic disturbances in obese individuals has been investigated before however, it is still not well-studied if exercise counteracts disturbances in brain function and connectivity of obese individuals.

C. By comparing group 2 with group 4 it is possible to study the effect of stroke in exercising obese animals. Here it is interesting to see if stroke has the same impact as in obese animals that do not get exercise as intervention (A).

D. By comparing group 3 with group 4 it is possible to study efficacy of exercise against adverse effects of obesity in combination with stroke. If exercise can restore stroke effects in obese mice, we can longitudinally study the underlying mechanisms of repair in this experimental setting. These results can be eventually translated to the clinics to develop new treatment strategies for obese stroke patients which are desperately needed.

In figure 3 is visualized that we can follow up changes in almost all experimental parameters over time. We will assess baseline measurements for most parameters in obese animals without a stroke. Comparing these baseline measurements to the first measurement after stroke, we can analyze the deterioration caused by the stroke shortly after surgery. All measurements after tMCAo can be compared to our baseline results which act as our “control” measurements making an extra control murine group superfluous.

Measurement 2 (mid-term post-stroke) and 3 (long-term post-stroke) will enable us to investigate the recovery after stroke induction. The repetitive MRI scans make it possible to analyze structural and functional changes of the brain in different experimental groups over time. Furthermore, we can also look for spontaneous arising small vessel disease markers, e.g. microinfarct, white matter lesions etc.

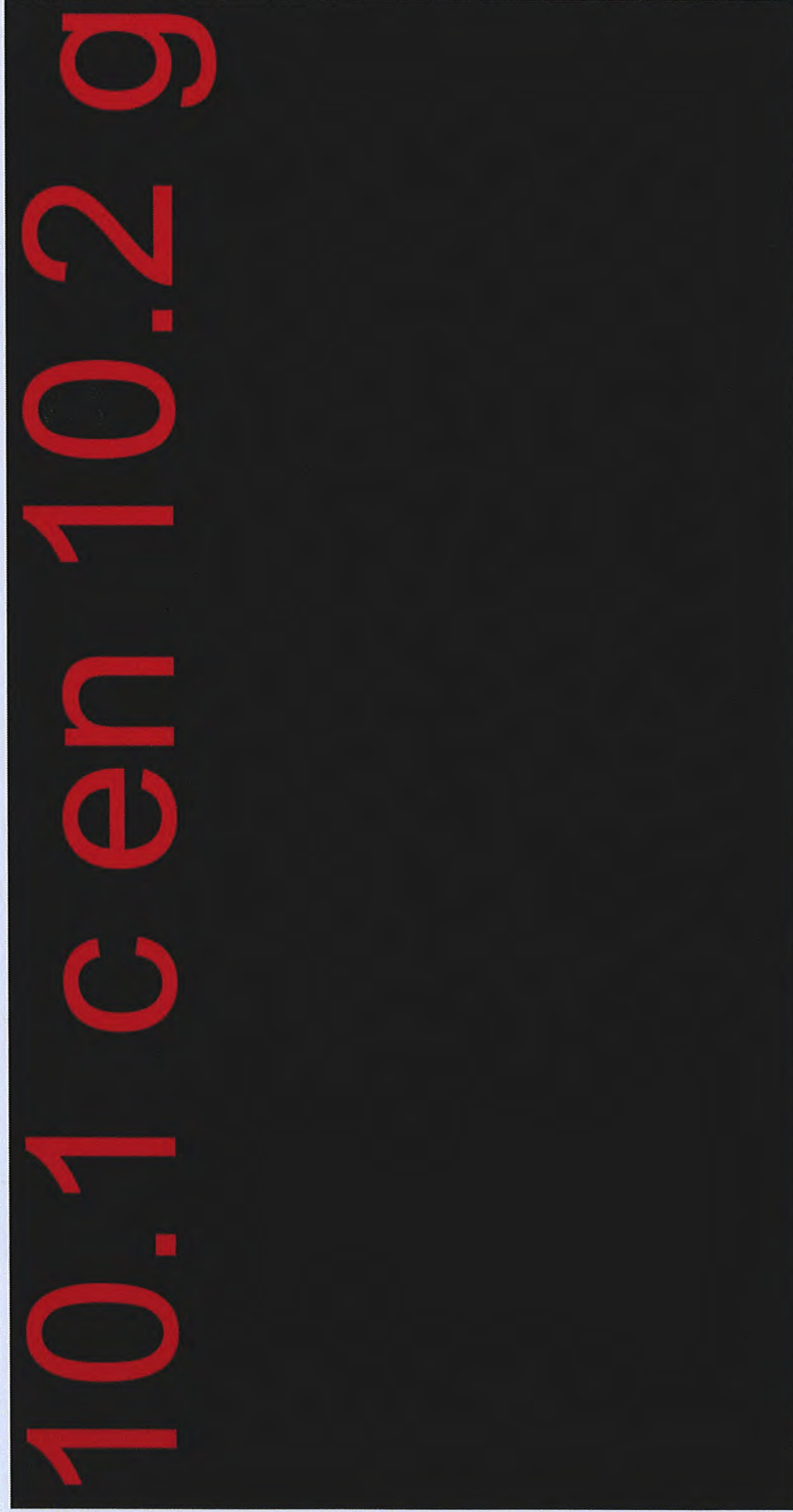


Figure 3. **10.1 c en 10.2 g** magnet resonance imaging (MRI)/cerebral small vessel (CSVD) disease marker over short- (2 weeks post-stroke), mid- (10 weeks post-stroke), and long-term (19 weeks post-stroke).

Furthermore, we also have an internal control per mouse, since stroke is only induced in one hemisphere of the brain. Therefore, we can compare the stroke affected with the healthy hemisphere when we perform MRI, immunohistochemical staining, and biochemical analysis. This can even be done in sham operated animals, to ensure that the control surgery has no effect on all mentioned parameters. Furthermore, both in sham and in stroke operated animals we can capture spontaneously occurring microinfarcts, since we perform MRI scans at three time points following a longitudinal study design. In the main experiment (male mice) we will induce a go-/no-go moment: If the mortality of the first cohort of the main study (n=24 animals) is exceeding our estimated mortality, we will not proceed with the study (sham=25% mortality, stroke=35% mortality).

We did not implement non-obese animals in our study, since in several studies the impact of stroke in obese vs non-obese animals has been studied before. Results of these studies were in detail reviewed by Haley et al. (PMID: 27655337). In addition, in all groups it is possible to study the effects of sham stroke induction as well as exercise and non-exercise in all parameters over time (Figure 3). In all groups we perform baseline measurements before stroke induction which can be compared to acute-, mid-, and long-term read out all performed the post-surgery. This longitudinal design is unique and has never been performed before (Figure 3).

#### Training group (performed before the main experiment):

The implementation of a training group before we will start with main experiment is meant to optimize and standardize the stroke induction (tMCAO) and the handling of the animals during the MRI scans. Importantly, we have already induced such an experimental stroke in wildtype (DEC 2014-171, 2017-0021, 2015-0079), but also in transgenic mice (DEC 2015-0079). Based on our collected experience and results from these studies, we have learned that especially in a novel transgenic mouse strain (like the Alzheimer-model mice used in 2015-0079) as the **10.1.c.en.10.2.g** mice proposed in this new application, the stroke surgery needs to be optimized before starting the main experiment. Our highly trained and experienced biotechnician will also need to optimize and practice the stroke induction and surgery for this typical murine model, the **10.1.c.en.10.2.g** mice, using therefore a small number (n=15) of HFD-induced obese **10.1.c.en.10.2.g** animals. We will perform the experiment in two batches with 7/8 animals per group to be able to improve all procedures in case of high mortality in the first batch. The main reason for this additional "training" group is that due to feeding a HFD these transgenic mice might develop fat in and around the surgical area creating differences compared to former performed surgeries in wildtype and Alzheimer mice (i.e. find and insert the filament in the blood vessels which may be more difficult to find because they may be embedded in more fat tissue, requiring fat removal around the surgery area). Furthermore, it might be possible that the anatomy and location of the blood vessel slight differs in **10.1.c.en.10.2.g** mice in comparison to the animal models which we operated before (wildtype and Alzheimer mice). Therefore, we want to be prepared for the main study to avoid any additionally discomfort and to achieve optimal and standardized results during the actual experiment (refinement). After this surgery, we will closely follow up the mice for 1 week and check on physiological parameters (e.g. weight, food intake), home cage activity (monitored via **10.1.c.en.10.2.g** and video recorded 24/7 via standard Phenotypers), and neurological screening (i.e. open field) is performed. One week postsurgery, mice will undergo a brain MRI (~1-2h) under anesthesia to validate the success of the stroke induction. As positioning the mice in the scanner and operating the scanner requires some skill, the neuroimaging procedures will also be optimized before the start of the main experiments (refinement). This optimization should minimize stress for the animals used during the actual neuroimaging experiments. After the MRI, without waking up again from anaesthesia, all animals will be sacrificed and tissue will be obtained for post-mortem analysis (e.g. brain, liver, fat) to mimic the real experimental situation and to prove success of stroke induction in these **10.1.c.en.10.2.g** mice. In addition, based on the results of the training group it is not possible to estimate success or failure of the main experiment due to insufficient statistical power (n=15).

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

A) Training group to optimize and standardize stroke induction (tMCAO) in these HFD-induced obese **10.1.c.en.10.2.g** mice, performed in 2 batches of 7/8 animals per batch:

1. At 4-6 weeks of age, **10.1.c.en.10.2.g** male mice will be transported from **10.2.e.en.g**, where all behavioral tests and neuroimaging scans will be performed.

2. After 1-2 weeks of acclimatization switch to HFD in all **10.1 c en 10.2 g** mice for a duration of at least 6 weeks to induce obesity (switch to HFD defined as t=0 week).
3. Stroke surgery at t=6 weeks:  
Experimental stroke will be induced by a middle cerebral artery occlusion via an intraluminal suture technique. This technique is less invasive than other techniques mimicking human stroke in animals, e.g. there is no need to open the skull for this type of operation. This model mimics ischemic stroke in the MCA territory which is the brain region that is affected in 80% of all stroke patients. In our study we use silicon rubber-coated monofilaments as occluding sutures. Several studies have shown that silicone rubber-coated monofilaments are superior to other types of monofilaments inducing consistent ischemic brain injuries even when performed by inexperienced surgeons. There are also other MCA occlusion techniques available using other types of sutures, electrocoagulation, and mechanical occlusion of the MCA with micro aneurysm clips or also topical application of Endothelin-1 to MCA. Stroke induction is considered to be successful when the cerebral blood flow (CBF), measured with a laser doppler which is attached to the skull of the animals before surgery, is dropping 80%. These last mentioned techniques are partially more invasive, lead to more discomfort for the animals and/ or are not enabling a reperfusion after an occlusion, which is the most interesting point for our study.
4. Recovery is closely monitored every day by assessing (physiological) parameters (e.g. weight, food intake, water intake), home cage activity (monitored via DVC, and video recorded 24/7 via standard Phenotypers), and neurological screens (i.e. open field) during the first postsurgery week.
5. **10.1 c en 10.2 g**  
**[REDACTED]**, physiological parameters such as heart rate and body temperature are closely monitored and supported. Temperature is maintained at 36-37°C with a warm air flow. The entire neuroimaging paradigm **10.1 c en 10.2 g** will take a maximum of 2 hours per mouse. Immediately after the scan the animals will be sacrificed without waking up from anaesthesia and tissue will be obtained for post-mortem analysis (e.g. brain, liver, fat).

**B) Main experiment to investigate the effect of voluntary exercise after a transient Middle Cerebral Artery occlusion (tMCA) in high fat diet induced obese **10.1 c en 10.2 g** mice**

# 10.1 c en 10.2 g

HFD=High fat diet; BS=Blood samples; SBP=Systemic blood pressure; MRI=Magnet resonance imaging; ORT=Novel object recognition test; IHC=Immunohistochemistry; BHC=Biochemical analysis; PLJ=Polarized light imaging

Figure 4 3 General study design of the main experiment. More details about the study design can be found in the document "description of animal procedures, Figure 2".

1. At 4-6 weeks of age **10.1 c en 10.2 g** mice will be transported from **10.2 .e. en g** where all behavioural tests and neuroimaging scans will be performed.
2. After two weeks of acclimatization switch to HFD in all **10.1 c en 10.2 g** mice for a duration of at least 6 weeks before baseline measurements to induce obesity (switch to HFD defined as t=0 week).
3. Baseline measurements before experimental stroke induction:
  - physiological parameters (e.g. weekly weighing, systolic blood pressure, blood sampling)
  - feces collection for gut microbiota analysis
  - motor skills (e.g. Strengths: Grip test; Coordination: Pole test, Rotarod) and motor activity (Open field, Running wheel activity)
  - cognitive test (e.g. Morris water maze, Novel object recognition test)
4. Surgery and allocation to treatment groups at approximately 3,5 months of age (t=9 weeks):
  - transient MCAo: Inducing mild experimental stroke or performing sham surgery (control)
  - installing running wheels in the cages of exercise group (treatment) and blocked running wheels in the cages of sedentary group (control)



In total 4 experimental groups:

- (1) 10.1 c en 10.2 g stroke + exercise (n=19)
- (2) 10.1 c en 10.2 g sham + exercise (n=17)
- (3) 10.1 c en 10.2 g stroke + sedentary (n=15)
- (4) 10.1 c en 10.2 g sham + sedentary (n=13)

5. Post-stroke measurement:

- During the first week after stroke, recovery is closely monitored every day by assessing (physiological) parameters (10.1 c en 10.2 g

Recovery short-term postsurgery (approxm. 1 months post-stroke):

- motor skills (e.g. Strengths: Grip test; Coordination: Pole test, Rotarod) and motor activity (Open field, Running wheel activity)
- neuroimaging (under anaesthesia)

Recovery mid-term postsurgery (approxm. 3 months post-stroke):

- assessing cognitive skills (learning and memory) after experimental stroke (e.g. Novel object recognition)
- neuroimaging (under anaesthesia)

Recovery long-term postsurgery (approxm. 6 months post-stroke):

- motor skills (e.g. Strengths: Grip test; Coordination: Pole test, Rotarod) and motor activity (Open field, Running wheel activity)
- assessing and recovery of cognition (learning and memory) after experimental stroke (reverse Morris water maze)
- neuroimaging (under anaesthesia), sacrifice animals and harvesting organs (e.g. brain, liver, fat)

For practical reasons, not all animals can be handled at one time when inducing experimental stroke. Therefore, the total number of mice needed to obtain statistically relevant data have to be divided in at least two cohorts/batches.

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

Our aim in this project is to study the effect of voluntary exercise (running wheels) as therapeutic approach after an experimental stroke induction on structural and functional brain changes, motor abilities, and cognition in high-fat diet induced obese, stroke/sham operated mice. We want to implement the training group to give our already highly trained biotechnician the opportunity to optimize and standardize the stroke surgery in small number of animals to prevent fall-out of animals in the main experiment. We want to closely monitor the health, physiological parameters and activity in the first week after stroke. After 7 days we will confirm the success of the stroke induction with MRI. The training group will be performed in 2 batches with 7/8 animals to be able to optimize the procedures in case of high mortality. Due to time consuming MRI scans (under

anaesthesia) and surgeries (tMCAO), the main experiments are performed in a time shifted manner of at least 2 cohorts. In first instance we will be using male **10.1 c en 10.2 g** mice to avoid the confounding effects of ovarian hormones in female mice that have been extensively reported to exert powerful vascular effects. In this main experiment (male mice) we will induce a go-/no-go moment: if the mortality of the first cohort of the main study (n=24 animals) is exceeding our estimated mortality, we will not proceed with the study (sham=25% mortality, stroke=35% mortality). After the experiments using 64 male mice to test the effect of voluntary exercise on stroke, a second go/no-moment is introduced. Only if significant effects of voluntary wheel running are observed in male mice, voluntary wheel running will also be tested after an experimental stroke in 64 female **10.1 c en 10.2 g** mice. This procedure was applied in one of our former studies, where we tested first in male and later in female mice, a specific multi-nutrient diet as a therapeutic approach after an experimental stroke (same stroke model as in this proposed study **10.2 .e. en g** ). We found more dietary effects in the male stroke mice than in the female stroke mice. Also stroke effects were more severe in male than female mouse. Therefore, we have decided to introduce a go/no-go-moment in this new stroke study testing the effect of voluntary exercise as a therapeutic approach after an experimental stroke. Only if we observe exercise effects in the male stroke mice, exercise will be tested after experimental stroke in 64 female stroke **10.1 c en 10.2 g** mice.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Type of animal procedure concerning voluntary exercise after a transient Middle Cerebral Artery occlusion (tMCAO) in high fat diet induced obese <b>10.1 c en 10.2 g</b> mice



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

T.a.v. 10.2 e. en g

Postbus 9101 HP231

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD10300202010305

**Bijlagen**

2

Datum 8 december 2020

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2 e. en g

Op 2 juli 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Effect of voluntary exercise on recovery after an ischemic stroke in high-fat diet induced obese 10.1 c en 10.2 g mice" met aanvraagnummer AVD10300202010305. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij wijzen uw aanvraag af. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) niet is toegestaan het project "Effect of voluntary exercise on recovery after an ischemic stroke in high-fat diet induced obese 10.1 c en 10.2 g mice" te starten.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 26 oktober 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

#### *Nadere vragen aanvrager*

Op 13 juli 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op aspecten van de aanvraag waarvan de DEC heeft aangegeven dat deze nog onvoldoende waren uitgewerkt om tot een toetsing van het project te kunnen komen. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Datum:**  
8 december 2020  
**Aanvraagnummer:**  
AVD10300202010305

#### **Overwegingen**

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

#### Opbrengsten project

Conform artikel 10a2, aanhef, tweede lid, onder a, van de Wod, worden wij geacht om een beoordeling te maken van de doelstellingen van het project en de voorspelde wetenschappelijke opbrengsten of educatieve waarde.

In het projectvoorstel staan de volgende doelstellingen beschreven:

- 1) onderzoeken wat het korte- en lange termijn effect is van lichaamsbeweging op obese muizen die herstellen van een herseninfarct (hierna, doel 1).
- 2) onderzoeken of obesitas leidt tot veranderingen in de pathologie van herseninfarcten en in de gevolgen van een infarct op hersenfunctie en -structuren, en welke mechanismen daarbij een rol spelen (hierna, doel 2).

Wij zijn net als de DEC niet overtuigd van de haalbaarheid van de doelstellingen, omdat de strategie en experimentele opzet niet geheel logisch aansluiten bij de doelstellingen van het project en derhalve niet kunnen leiden tot het behalen van de beschreven doelstellingen.

De DEC twijfelt aan de translationele waarde van het kunstmatig geïnduceerde CVA muismodel, omdat de dieren veel sneller herstellen en niet de complicaties hebben die bij spontane infarcten bij mensen optreden. Ook acht de DEC het waarschijnlijk dat de langdurige individuele huisvesting de dieren een negatieve invloed heeft op de vertaalbaarheid van de resultaten, omdat deze sterk afwijkt van de natuurlijke situatie en niet voorziet in de natuurlijke behoeften van de dieren. In de ogen van de DEC zal het project in haar huidige vorm daarom enkel in beperkte mate bijdragen aan de reeds bestaande kennis over het effect van lichaamsbeweging op herstel na een herseninfarct van obese **10.1 c en 10.2 g** muizen (doel 1). Wij onderschrijven het oordeel van de DEC op deze punten.

Daarnaast onderschrijven wij het oordeel van de DEC dat de gekozen onderzoeksofzet niet geschikt is om te onderzoeken wat het effect is van obesitas op pathologie en gevolgen van een herseninfarct, en van de

mechanismen die daaraan ten grondslag liggen (doel 2), door het ontbreken van een niet-obese referentiegroep. De DEC geeft aan dat er weliswaar veel onderzoek is gedaan naar de effecten van herseninfarct in obese vs niet-obese dieren, maar niet met deze specifieke muizenstam (10.1 c en 10.2 g). Dit model is in de ogen van de DEC niet vergelijkbaar met andere muismodellen voor obesitas, omdat dit model qua genexpressie, pathways en upstream-regulatoren meer met de mens overeenkomt. Ook onderschrijven wij het oordeel van de DEC dat u door de gekozen opzet zonder een gestandaardiseerd bewegingsregime mogelijk veel variatie introduceert in de belangrijkste experimentele variabele, namelijk lichaamsbeweging. Hierdoor kan mogelijk geen betrouwbare uitspraak gedaan worden over het effect van lichaamsbeweging.

**Datum:**  
8 december 2020  
**Aanvraagnummer:**  
AVD10300202010305

Op basis van de bovenstaande afwegingen oordelen wij dat de verwachte wetenschappelijke opbrengsten van het project beperkt zijn.

#### Vervanging, vermindering en verfijning

Bij de beoordeling van een projectvergunningsaanvraag dienen wij te beoordelen of het project in overeenstemming is met artikel 10 van de Wod, zoals vermeld in artikel 10a2, tweede lid, aanhef, en onder b, van de Wod. Bij deze beoordeling kijken wij onder andere of het project voldoet aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning.

In het licht van onze eerder benoemde bedenkingen wat betreft de transleerbaarheid van de onderzoeksresultaten van het project, onderschrijven wij het oordeel van de DEC dat de vraag of lichaamsbeweging een positief effect heeft op het herstel na een herseninfarct bij mensen met obesitas het beste in deze patiënten kan worden onderzocht. In onze ogen voldoet uw aanvraag daarom niet aan artikel 1d, lid 1, van de Wod, waarin staat dat een dierproef alleen mag worden uitgevoerd als het onderzoeksdoel niet zonder proefdieren kan worden bereikt.

Zoals eerder beschreven zijn wij voorts van oordeel dat de onderzoekopzet niet toereikend is om doel 2 van het projectvoorstel te behalen. Tevens zijn wij het eens met het oordeel van de DEC dat voor het beantwoorden van de translationele onderzoeksvraag onder doel 1 slechts 2 groepen noodzakelijk zijn, in plaats van de 4 groepen in het huidige projectvoorstel. Te weten, obese dieren die na de inductie van een herseninfarct wel of juist geen extra lichaamsbeweging ontvangen. Ook onderschrijven wij het oordeel van de DEC dat de gekozen proefopzet, waarin de hoeveelheid lichaamsbeweging op vrijwillige basis wordt bepaald, waarschijnlijk leidt tot meer variatie, en daarmee een hoger aantal benodigde dieren, dan strikt noodzakelijk is voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag. Daarnaast zorgt deze proefopzet

in onze ogen voor veel ongerief, doordat deze langdurige individuele huisvesting noodzakelijk maakt. Deze huisvesting voldoet niet aan de behoeften van de dieren en komt hierdoor, zoals eerder beschreven, niet ten goede aan de transleerbaarheid van de onderzoeksresultaten. Wij zijn het daarom eens met het oordeel van de DEC dat er alternatieven denkbaar zijn voor lichaamsbeweging, die minder ongerief voor de dieren opleveren en mogelijk beter aansluiten bij de situatie van herseninfarctpatiënten. Wij zijn daarom van oordeel dat uw aanvraag ook niet voldoet aan artikel 1d, lid 2, en artikel 1d, lid 3, van de Wod waarin de wettelijke vereisten omtrent vermindering en verfijning worden beschreven.

**Datum:**  
8 december 2020  
**Aanvraagnummer:**  
AVD10300202010305

De bovenstaande overwegingen betekenen dat de aanvraag strijdig is met artikel 10, lid 1, onder a, van de Wod, waarin gesteld wordt dat het verboden is om een dierproef te verrichten voor een doel dat 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.

#### Beoordeling project op gebied van schade en baten

Bij de beoordeling van een projectvergunningaanvraag dient de CCD een analyse te maken van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachten resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu, zoals vermeld in artikel 10a2, lid 2, aanhef en onder d, van de Wod.

In het licht van de eerder beschreven bedenkingen op het gebied van de haalbaarheid van doel 2 zijn wij het eens met het oordeel van de DEC dat de potentiële opbrengsten van het project terug te brengen zijn tot de onder doel 1 beschreven inzichten. De potentiële baten van het project worden in onze ogen, en die van de DEC, ingeperkt door de beperkte transleerbaarheid van het gekozen diermodel en de proefopzet, zoals beschreven onder het punt haalbaarheid. Tot slot heeft de DEC ons erop gewezen dat de relevantie van de opbrengsten van het project voor de behandeling van obese CVA-patiënten minimaal is, omdat de huidige behandelrichtlijn lichaamsbeweging/fysiotherapie in de herstelfase voorschrijft en patiënten met obesitas reeds adviseert om af te vallen en meer te bewegen. De resultaten van het project zullen daarom in de ogen van de DEC maximaal leiden tot verdere onderbouwing voor de reeds bestaande revalidatiestrategieën voor het bevorderen van het herstel na een herseninfarct, hetgeen wij als een beperkt belang beoordelen.

Tegenover dit belang staat het ernstige ongerief dat de proefdieren in het kader van het project zal worden berokkend. Net als de DEC zijn wij van oordeel dat het beperkte belang van het project niet opweegt tegen het ernstige ongerief voor de proefdieren. Onze analyse van de schade en de baten die het project oplevert, zoals bedoeld in artikel 10a2, lid 2 aanhef en onder d van de Wod, valt hiermee negatief uit. Uw aanvraag is daarmee tevens in strijd met artikel 10, eerste lid, onder c, van de Wod. Dit betekent dat niet is toegestaan om het project uit te voeren.

**Datum:**  
8 december 2020  
**Aanvraagnummer:**  
AVD10300202010305

### **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 93118, 2509 AC 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

8 december 2020

**Aanvraagnummer:**

AVD10300202010305

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving





**Aanvraagnummer:**

AVD10300202010305

## Weergave wet- en regelgeving

### Artikel 1d

1 Een dierproef wordt slechts verricht wanneer het beoogde resultaat niet kan worden bereikt door middel van een wetenschappelijk verantwoorde methode of onderzoeksstrategie waarbij geen levende dieren worden gebruikt.

2 Het aantal dieren dat in projecten wordt gebruikt, wordt tot het minimum beperkt zonder dat de doelstellingen van het project in gedrang komen.

3 Het fokken, de huisvesting en de verzorging van dieren en de in dierproeven gebruikte methoden worden verfijnd, zodat elke vorm van pijn, lijden, angst en blijvende schade die de dieren kunnen ondervinden, wordt voorkomen of tot het minimum wordt beperkt.

4 Indien er een keuze tussen methoden als bedoeld in het eerste lid mogelijk is, vindt de keuze plaats overeenkomstig artikel 10, tweede lid.

### Artikel 10

1 Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel

- a. 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;
- b. dat kan worden bereikt met behulp van een andere methode of beproevingsstrategie waarbij geen levende dieren worden gebruikt en die in de wetgeving van de Europese Unie is erkend;
- c. waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.

2 Ingeval er verschillende mogelijkheden bestaan om een dierproef te verrichten, wordt de dierproef geselecteerd die in de hoogste mate aan de volgende voorwaarden voldoet en naar verwachting bevredigende resultaten oplevert:

- a. er wordt een zo gering mogelijk aantal dieren gebruikt;
- b. de betrokken dieren zijn dieren die het minst gevoelig zijn voor pijn, lijden, angst of blijvende schade;
- c. de desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade.

3 Het is verboden een dierproef te verrichten door middel van LD50/LC50 test-methoden.

4 Van het in het derde lid bedoelde verbod kan door Onze Minister vrijstelling worden verleend voor een periode van maximaal vijf jaar indien wordt aangetoond dat voor de in dat lid genoemde methoden geen alternatief aanwezig is.

**Aanvraagnummer:**

AVD10300202010305

**Artikel 10a2**

1 De centrale commissie dierproeven verleent slechts een projectvergunning voor een project indien:

- a. het project vanuit wetenschappelijk of onderwijskundig oogpunt verantwoord of wettelijk vereist is;
- b. de doeleinden van het project het gebruik van dieren rechtvaardigen;
- c. het project zo is opgezet dat de dierproeven zo humaan en milieuvriendelijk mogelijk kunnen worden uitgevoerd; en
- d. het project is opgezet overeenkomstig artikel 9.

2 De projectbeoordeling omvat in het bijzonder

- a. een beoordeling van de doelstellingen van het project en de voorspelde wetenschappelijke opbrengsten of educatieve waarde;
- b. een beoordeling van de vraag of het project in overeenstemming is met artikel 10;
- c. een beoordeling van de indeling van het project naar de ernst van de dierproeven;
- d. een analyse van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu;



## Ethisch toetsingskader voor proefdiergebruik *Praktische handreiking voor Dierexperimentencommissies*

### *Inleiding*

Het uitgangspunt van de Wet op de dierproeven (Wod) is dat dieren een intrinsieke waarde hebben die moet worden gerespecteerd. Daaruit volgt het *nee, tenzij ...* beleid met betrekking tot het gebruik van proefdieren. Dit standpunt houdt in dat als proefdieren voor onderzoek worden gebruikt er een ethische afweging nodig is of het belang en de haalbaarheid van het project opwegen tegen het gebruik van de proefdieren en de mate van ongerief van proefdieren. Meer concreet wordt onder '*tenzij*' verstaan a) dat voldaan wordt aan de randvoorwaarden voor de invulling van de 3 V's en b) dat de waardering van het doel zwaarder weegt dan de aantasting van (dier gerelateerde) waarden.

De Wod schrijft voor, Art 10a2, lid 2 sub d, dat er een schade-baten afweging gemaakt moet worden voor het gebruik van dierproeven. Een moeilijkheid bij die afweging is dat de factoren die ten opzichte van elkaar gewogen moeten worden niet direct vergelijkbaar zijn. Het ongerief van de dieren moet namelijk gewogen worden tegen de baten voor de mens, andere dieren of het milieu. De schade-baten afweging is dan ook niet zo zeer een kwantitatieve afweging als wel een morele afweging die afhankelijk is van de specifieke situatie zoals beschreven in het projectvoorstel. Het ethisch toetsingskader geeft u een handreiking, zodat de stappen van de analyse en de uiteindelijke morele afweging gestructureerd, volledig en transparant weergegeven kunnen worden.

De morele aspecten zullen zelden op een neutrale en volledige wijze gepresenteerd worden. De onderzoeker heeft immers belang bij het uitvoeren van het onderzoek. Bovendien zal de projectaanvraag, die voor een advies aan de DEC wordt aangeboden, door de verschillende leden verschillend worden gelezen. Emoties en intuïties kunnen opspelen en de voorliggende informatie zal verschillend geïnterpreteerd worden. Het is voor de afweging daarom nodig om eerst een goed beeld van het morele probleem en de context te krijgen.

Het ethisch toetsingskader onderscheidt daarvoor de volgende stappen:

- I) Probleem definiëren
- II) Probleem analyseren
- III) Probleem wegen
- IV) Advies

Bovengenoemde stappen worden hieronder in meer detail beschreven.

### *Stap I) Probleem definiëren*

*A) Wat is de centrale morele vraag voor de DEC met betrekking tot het project?*

In zijn algemeenheid ziet de centrale morele vraag er als volgt uit: rechtvaardigt het directe doel van het project, indien van toepassing aangevuld met het uiteindelijke doel, en de haalbaarheid van het project het ongerief dat dieren wordt aangedaan?

*B) Is er een alternatief voor het proefdiergebruik beschikbaar?*

Onderzoek met dieren mag niet worden uitgevoerd als er alternatieven zijn (*nee, tenzij*- Art1d, lid 1, Wod). Het is daarom van belang voor elke aanvraag te beoordelen of de doelstelling ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef.

*C) Welke moreel relevante feiten zijn van belang voor de afweging door de DEC? Moreel relevante feiten zijn onder meer:*

*1. Is er sprake van verboden dierproeven (Art. 10 Wod) of zijn dieren afkomstig van een verboden bron (Art. 11 Wod)?*

In de politieke besluitvorming is al een aantal keuzes gemaakt. Zo is het niet toegestaan om LD50/LC50-methoden toe te passen (Art. 10, lid 3 Wod) en mogen geen proeven worden gedaan waarbij gebruik wordt gemaakt van chimpansees, bonobo's, orang-oetans en gorilla's (Art. 10e, lid 1 Wod). Daarnaast gelden er beperkingen bij dierproeven waarbij gebruik gemaakt wordt van de volgende categorieën dieren: bedreigde diersoorten (Art. 10e, lid 4 Wod), niet-menselijke primaten (Art. 10e Wod), dieren in/uit het wild (Art. 10f Wod), zwerfdieren en verwilderde dieren (Art. 10h Wod) en dieren die behoren tot één van de soorten genoemd in bijlage I van richtlijn 2010/63/EU, maar niet speciaal voor het gebruik in dierproeven zijn gefokt (Art. 11 Wod). Het uitgangspunt is dat deze categorieën dieren niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van de proef niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van deze categorieën dieren nog specifieke beperkende voorwaarden. Indien er sprake is van bovengenoemde categorieën dieren is het daarom van belang te beoordelen of aan alle in de wet genoemde beperkende voorwaarden is voldaan.

*2. Beschrijf de mate van ongerief (Art. 10b Wod) en de aantasting van de integriteit.*

Voor de ethische toetsing is het van belang dat de DEC een scherp beeld heeft van waar de de welzijnsaantasting en integriteitsaantasting van de dieren uit bestaat. De ernst van een procedure wordt bepaald aan de hand van mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die een individueel dier tijdens de procedure naar verwachting zal ondervinden. Bij de beoordeling van de ernst van de welzijnsaantasting (ongeriefsclassificatie) dient aandacht besteed te worden aan de verschillende factoren die het welzijn kunnen aantasten en hoe de cumulatieve aantasting van het welzijn wordt geclassificeerd. Hierbij kan niet alleen gedacht worden aan directe gevolgen van de dierproeven, maar bijvoorbeeld ook aan ongerief veroorzaakt door het type huisvesting en aantasting van het fenotype. Integriteit verwijst naar de heelheid en gaafheid van een dier en is gerelateerd aan het soortspecifiek en zelfstandig kunnen functioneren van een dier. Het begrip staat los van de vraag of het welzijn of de gezondheid van het dier ook werkelijk in het geding is. De integriteit van een dier kan fysiek worden aangetast door het lichaam of de werking van het lichaam te veranderen, gedragsmatig worden aangetast door geen ruimte te geven aan het natuurlijke gedrag van het dier en mentaal worden aangetast door ongewenst gedrag weg te selecteren of te sederen. De integriteit van proefdieren is alleen al aangetast vanwege het feit dat ze als proefdier gebruikt worden. Het is van belang die integriteitsaantasting te benoemen die veroorzaakt wordt door de handelingen aan het dier en de opzet van de proef.

*3. Worden de 3 V's voldoende geborgd (Art. 1d, lid 1 – 3 en Art. 13 Wod)?*

In de Wod is vastgesteld dat niet meer dieren gebruikt mogen worden dan nodig, maar ook niet minder dan nodig voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat. Daarnaast moeten de gebruikte methoden worden verfijnd, zodat elke vorm van pijn, lijden, angst en blijvende schade die de dieren kunnen ondervinden, wordt voorkomen of tot het minimum wordt beperkt (Art. 1d ). De DEC verzekert zich ervan dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het mogelijke ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij dient onder andere gekeken te worden naar pijnbestrijding en huisvesting. Er kan alleen worden afgeweken van de uitgangspunten dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd en dieren die pijn lijden behandeld worden met geschikte pijnbestrijdingsmethoden als het toedienen van de verdoving traumatischer is voor het dier dan de dierproef zelf of de te gebruiken methodes niet verenigbaar zijn met het doel van de dierproef (Art. 13 Wod).

Het uitgangspunt is dat dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die minimaal voldoet aan de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Afwijken hiervan mag alleen indien dit in voldoende mate wetenschappelijk is onderbouwd of om redenen van dierenwelzijn en diergezondheid (Art. 7 Dierproevenbesluit 2014). Bovendien hecht de CCD aan een zorgvuldige beschrijving van de criteria voor humane eindpunten (HEP) (Art. 13b, lid 1 Wod) en een zorgvuldige beschrijving en rechtvaardiging van de reden en wijze van doden van de proefdieren tijdens of aan het einde van het experiment (Art. 13c Wod). Indien een dodingsmethode gebruikt wordt die óf niet beschreven is in bijlage IV van de hiervoor genoemde richtlijn óf slechts onder voorwaarden toegepast mag worden, dient beoordeeld te worden of de aanvrager voldoet aan de eisen van de wet (Art. 13c, lid 3 Wod). Het gebruik van een methode die niet in bijlage IV staat beschreven is slechts toegestaan indien uit een

wetenschappelijke motivatie blijkt dat het doel van de proef anders niet kan worden bereikt of er ontheffing is verleend door de Minister.

Bij wettelijk voorgeschreven onderzoek wordt vaak verwezen naar voorgeschreven richtlijnen. Deze richtlijnen zijn echter niet altijd zo star als beschreven. Het is daarom van belang te controleren of bij wettelijk voorgeschreven onderzoek alternatieve methoden gebruikt mogen worden zonder dieren, met minder dieren of minder ongerief.

Een ander aspect dat bij de verstrekking van vergunningen wordt meegewogen is of de aanvrager de vermindering van proefdieren in voorraad gedood voldoende heeft verkend en betrokken bij de proefopzet. Dat betreft ook de dieren die op bestelling worden geleverd door een fokker. Hoewel deze groep dieren volgens de Wod niet worden gezien als proefdier, maken zij wel impliciet onderdeel uit van het project, omdat bijvoorbeeld het onderzoek in het project slechts gebruik maakt van één geslacht of omdat men slechts gebruik maakt van dieren met specifieke kenmerken of een specifieke leeftijd. In de samenleving worden er veel vragen gesteld bij het doden van 'voorraad' dieren en inmiddels ook over de translatie naar de mens bij het gebruik van één geslacht. De onderzoeker moet laten zien zich hier bewust van te zijn en goed te onderbouwen waarom eventueel toch voor één geslacht wordt gekozen. Het is van belang deze onderbouwing te toetsen en een plaats te geven in de morele afweging naar de rechtvaardiging van het project. Daarbij kan het voorkomen dat het aantal dieren in de proef zelf toeneemt, maar minder dieren in voorraad worden gedood of meer kennis wordt ontwikkeld omdat translatie naar de mens beter mogelijk is.

#### *4. Wat is het belang van het onderzoek (Art. 1c Wod) en hoe hoog schat u dat in?*

In de Wod worden de volgende doeleinden beschreven waarvoor proefdieren gebruikt kunnen worden: 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 en forensisch onderzoek.

Het kunnen plaatsen van een project in bovenstaande categorieën is echter niet voldoende om het gebruik van dieren te kunnen rechtvaardigen. In de projectaanvraag wordt naast bovengenoemde doeleinden ook een omschrijving van zowel het specifieke (directe) doel als het uiteindelijke doel, ofwel het belang, gegeven. Beide zijn voor de ethische afweging van belang. Om tot een oordeel te kunnen komen zal duidelijk gemaakt dienen te worden dat er een directe en reële relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. Dit betekent dus dat het waarschijnlijk is dat het uiteindelijke doel op korte termijn behaald zal worden. Bij fundamenteel onderzoek is de relatie tussen het directe doel (bijvoorbeeld het leveren van inzichten in bepaalde mechanismen van organismen) en het uiteindelijke doel (bestrijding van ziekten bij de mens) over het algemeen echter niet zo duidelijk. Het is dan van te voren niet in te schatten of het uiteindelijke doel daadwerkelijk behaald zal worden. De relatie tussen het directe doel en uiteindelijke doel zal dan met terughoudendheid verwoord dienen te worden. Bij de ethische weging kunt u afwegen of het doen van fundamenteel onderzoek op zich mogelijk voldoende rechtvaardiging is voor proefdiergebruik.

Het kan dus voorkomen dat de DEC tot de conclusie komt dat het directe doel weliswaar haalbaar is, maar dat de bijdrage aan het uiteindelijke doel beperkt zal zijn of zeer onzeker is. Dat gegeven is van belang bij de uiteindelijke afweging.

Voor de ethische afweging is niet alleen van belang te beoordelen of de doelstelling haalbaar is, maar ook of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

#### *5. Zijn kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd (Art 9, 13f, 14c Wod)?*

Het is van belang te beoordelen of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere personen die betrokken zijn bij de dierproeven voldoende zijn gewaarborgd. Dit is van belang vanuit het oogpunt van haalbaarheid van het project. Er dient echter ook voldoende kennis en kunde aanwezig te zijn om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Het is moreel niet aanvaardbaar om dierproeven te doen als niet aan deze zorgvuldigheidseisen wordt voldaan.

#### *6. Hoe realistisch acht u de geschetste haalbaarheid van het project?*

Het EC working document 'Project Evaluation and Retrospective Assessment' stelt dat zowel de

mogelijke uitkomst als de haalbaarheid van de doelstellingen van het project moet worden geanalyseerd en gewogen. Voor de ethische afweging is het van belang om te beoordelen of de doelstellingen realistisch zijn verwoord en of met de voorgestelde dierexperimenten en betrokken personen die doelstellingen haalbaar zijn binnen de looptijd van het project. Het gebruik van proefdieren voor een bepaald project kan niet gerechtvaardigd worden als op voorhand helder is dat de doelstellingen niet op de beschreven wijze of met de betrokken personen behaald kunnen worden.

*7. Wet- en regelgeving met betrekking tot het project.*

Voor de ethische afweging is het van belang te signaleren of, en indien van toepassing waarom, er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod. U kunt zich beperken tot wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, zoals de Wet dieren en Flora en fauna wet. Indien niet aan alle relevante wetten voldaan kan worden en ook geen ontheffing kan worden verkregen bij de bevoegde instanties, kan het project niet worden uitgevoerd. Hiermee komt de haalbaarheid van het project in het geding. Het kan ook voorkomen dat een proef halverwege gestopt moet worden, omdat deze niet volgens wetgeving wordt uitgevoerd. In dergelijke situaties worden dieren onnodig gebruikt. Dit dient in het kader van 'vermindering' voorkomen te worden.

*8. Ontbreekt er informatie in algemene termen of ontbreken er literatuurverwijzingen die het doel of de opzet van het project onderbouwen?*

Bij het maken van de ethische afweging maakt u gebruik van bovenstaande moreel relevante feiten. Voor die afweging is het van belang dat u zich afvraagt in hoeverre de wetenschappelijke kennis, waarop het project gebaseerd is, compleet is en of die kennis eenduidig is. Zonder tot een diepgaand wetenschappelijk oordeel te komen, moet de DEC er van overtuigd zijn dat het projectvoorstel aansluit bij recente inzichten en geen belangrijke hiaten heeft die de bruikbaarheid van de resultaten beperken.

**Stap II) Probleem analyseren**

*A. Inventarisatie van alle belanghebbenden in het project*

Voor de ethische afweging is van belang inzicht te hebben in de belanghebbenden in het project. Mogelijke belanghebbenden zijn: doelgroepen, proefdieren, vergunninghouders en onderzoekers en andere voor het project relevante belangengroepen of entiteiten, zoals het milieu en de samenleving als geheel. Het gaat hier met name om primaire belangen. Indirecte belangen die mogelijk ooit op lange(re) termijn kunnen worden behaald dienen met terughoudendheid ingebracht te worden. Zij kunnen bij de ethische weging slechts beperkt een rechtvaardiging opleveren van het ongerief van dieren.

Tabel 1: Ethische Matrix, modificatie van Ethical Matrix, Ben Mephram. Enkele voorbeelden van kernwaarden voor de verschillende cellen zijn aangegeven.

Morele waarden	Welzijn	Autonomie	Rechtvaardigheid
Belanghebbenden			
Doelgroep(en) project	Kwaliteit, Veiligheid	Keuze vrijheid	Beschikbaarheid van bijvoorbeeld het product Proportionaliteit
Proefdieren	Gezondheid Pijn Stress	Natuurlijk gedrag	Alternatieven Proportionaliteit Intrinsieke waarde Integriteit
Vergunninghouder, Onderzoekers	Commerciële, wetenschappelijke ontwikkelingen	Vrijheid van handelen	Wetgeving (bestaande)
Andere voor het project relevante belangengroepen of entiteiten, zoals milieu en de samenleving als geheel	Conservatie	Biodiversiteit Natuurlijkheid	Duurzaamheid Voorzorg

### *B. Inventarisatie van de waarden die in het geding zijn of bevorderd worden*

Bij de morele afweging staat de vraag centraal of het doel van het project een aantasting van dier-gerelateerde waarden rechtvaardigt. Voor mens, dier, natuur en milieu kunnen waarden aangetast of juist bevorderd worden. Het is van belang te inventariseren welke waarden voor de verschillende belanghebbenden in het geding zijn of bevorderd worden. Hierbij kan gedacht worden aan morele waarden op het niveau van welzijn, autonomie en rechtvaardigheid. In tabel 1 worden, voor verschillende belanghebbenden, voorbeelden gegeven van waarden die in het geding zouden kunnen zijn op het niveau van welzijn, autonomie en rechtvaardigheid. De waarde van welzijn kan bij dieren bijvoorbeeld vertaald worden in termen van zorg en aandacht voor (a) het biologisch functioneren, (b) de ervaring van het eigen leven door het dier en (c) de mogelijkheden om soortspecifiek gedrag te vertonen. Respect voor de waarde van autonomie betekent bij onze omgang met mensen respect voor de vrijheid van keuze en handelen. Bij dieren, waarbij de capaciteit om autonome beslissingen te nemen (nog) niet bewezen is, gaat het om respect voor het natuurlijke gedrag van het dier. Tot slot kan een handeling om verschillende redenen al dan niet rechtvaardig zijn. Rechtvaardigheid richt zich op gelijkheid en eerlijkheid en houdt rekening met verschillen en overeenkomsten in termen van onder andere behoeften, belangen, prestaties of draagkracht.

### *Stap III) Probleem wegen*

In het kader van transparantie en uniformiteit van de ethische afweging van dierproefgebruik wordt de DEC gevraagd een aantal aspecten van de afweging expliciet te noemen:

#### *A. Vaststellen centrale morele vraag ( Zie Stap I) Probleem definiëren)*

#### *B. Weging van de belangrijkste belanghebbenden en waarden die in het geding zijn of bevorderd worden en onderbouwing van deze weging*

Zoals eerder aangegeven zal een projectaanvraag door mensen intuïtief verschillend worden gelezen en beoordeeld. Iemands morele intuïtie wordt namelijk gevormd door zijn achtergrond, zoals religie, filosofische of ideologische overtuigingen en sociaal-culturele achtergrond. Daarnaast zijn demografische kenmerken, zoals geslacht, opleiding en het hebben van een (in)directe relatie met het betreffende vraagstuk, van invloed op iemands morele intuïtie (Cohen et al).

Van belang is te bedenken dat mensen vanuit verschillende perspectieven hun ethische overwegingen inbrengen en een afweging maken. Daarbij kan onderscheid gemaakt worden in het consequentiaalistische (gevolgenethiek), het deontologische (beginslethiek) en het deugdeethiek perspectief. Bij een consequentiaalistische redenering ligt de nadruk op de waardering van de gevolgen van de handeling, zoals het nut, risico en toekomstige welzijnsaantasting. De gevolgenethiek is vertrouwd terrein voor de meeste DEC's en ook het meest tastbaar te duiden. Een deontologische redenering is meer principieel van aard en legt de nadruk op de waardering van de handeling zelf. Deontologische waarden zijn bijvoorbeeld autonomie van de mens en intrinsieke waarde en integriteit van het dier. Kernbegrip is hier 'het tonen van respect voor' waarden die ons nauw aan het hart liggen. De deugdeethiek tot slot heeft betrekking op de houding en het karakter van de persoon die handelt en is van belang bij de beoordeling van de context waarin de projectuitvoering plaatsvindt. Kernbegrip is hier de 'gevoelsmatige norm: dat doe je niet, is slecht/goed, zo gaan we niet met dieren om, we kunnen patiënten niet in de steek laten'.

De DEC wordt gevraagd mogelijk relevante overwegingen vanuit de hierboven beschreven perspectieven mee te nemen bij de ethische afweging en zich niet alleen te richten op mogelijke gevolgen.

Van de DEC wordt verwacht dat zij voor de verschillende belanghebbenden, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar weegt. Om dit proces te vergemakkelijken kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit bijvoorbeeld verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. U wordt ook gevraagd aan te geven waarom de DEC van mening is dat bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (schade) voor de andere belanghebbende.

Er is geen richtlijn te geven hoe de belangen en de daarmee samenhangende waarden van verschillende belanghebbenden ten opzichte van elkaar gewogen moeten worden. In de huidige maatschappij wordt het echter niet meer vanzelfsprekend gevonden dat elk doel ten behoeve van de mens zwaarder weegt dan de belangen van het dier. Onderzoek laat namelijk zien dat mensen (70%) een sterke emotionele band met dieren hebben en dat men dierenwelzijn heel belangrijk vindt (de Cock Buning, 2012). De samenleving kent aan verschillende diersoorten echter wel een verschillende status toe. Dit blijkt bijvoorbeeld uit de Europese richtlijn waarin, door het verbinden van strengere voorwaarden aan het gebruik van non-humane primaten, honden en katten, ook een verschillende status toegedacht wordt aan verschillende soorten proefdieren (Richtlijn 2010/63/EU, Art. 31). Dit betekent dat de belangen voor verschillende diersoorten anders gewogen kunnen worden.

Tot slot kunnen wet- en regelgeving relevante feiten zijn waaruit voortkomt dat proeven uitgevoerd moeten worden. U kunt hierbij denken aan toxicologisch onderzoek naar veiligheidsrisico's van stoffen. Europese regelgeving eist voor de registratie van stoffen onderzoek met proefdieren. Het testen van veiligheidsrisico's voor de mens zou daarmee voldoende rechtvaardiging kunnen zijn voor het gebruik van proefdieren. Echter, een dergelijke afweging gaat voorbij aan de vraag of die stoffen wel in die mate van belang zijn voor de mens dat zij het gebruik van proefdieren rechtvaardigen. Het belang van de te testen stoffen dient daarom ook bij wettelijk vereist onderzoek meegenomen te worden bij de ethische afweging. Bij het maken van de ethische afweging kunt u tot de conclusie komen dat het belang van het op de markt brengen van de desbetreffende stof dermate klein is dat het gebruik van proefdieren niet gerechtvaardigd is.

#### *C. Beantwoorden centrale morele vraag*

Voor het beantwoorden van de centrale morele vraag dient u gebruik te maken van bovenstaande afweging van waarden. Daarnaast dient u ook gebruik te maken van moreel relevante feiten zoals beschreven onder 'Stap I) probleem definiëren'. Het gaat dan om de volgende moreel relevante feiten: categorieën en herkomst dieren, 3V's, ongerief, belang onderzoek, kennis en kunde van betrokkenen, haalbaarheid doelstellingen en relevante wet en regelgeving. Het is, in het kader van transparantie, van belang te onderbouwen hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag.

### *Stap IV) Advies*

#### *A. Consensus of meerderheidsstandpunt*

Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt. Indien het advies gebaseerd is op een meerderheidsstandpunt is het, in het kader van transparantie, belangrijk om naast de weergave van argumenten voor het meerderheidsstandpunt ook de argumenten voor het minderheidsstandpunt weer te geven in het advies. De DEC wordt gevraagd het minderheidsstandpunt te specificeren op niveau van verschillende belanghebbenden van het project en de waarden die in het geding zijn voor elk van de belanghebbenden.

#### *B. Dilemma's*

Het is denkbaar dat tijdens het beoordelen van een aanvraag en het opstellen van het advies knelpunten en dilemma's naar voren komen, zowel binnen als buiten de context van het project, die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen. Hierbij kan gedacht worden aan doelen die gesteld worden in het licht van leefstijl gerelateerde aandoeningen van de mens of doelen die bijdragen aan ontwikkelingen in de veehouderij die steeds meer vergen van het individuele dier in haar productieomgeving. Dilemma's kunnen zich ook voordoen wanneer de opbrengsten van een project niet op lijken te wegen tegen de negatieve gevolgen voor dieren (proportionaliteitsbeginsel). Hierbij kan gedacht worden aan de wettelijke eis bij registratie van stoffen om eerder uitgevoerd onderzoek te herhalen (zoals effectiviteitstesten van elke batch generieke geneesmiddelen ten opzichte van het referentiemiddel, of herhaling van onderzoek vanwege (kleine) verschillen tussen internationale richtlijnen). Tot slot kunnen dilemma's zich ook voordoen wanneer er alternatieven beschikbaar zijn, waardoor volgens de Wod de dierproeven niet uitgevoerd zouden mogen worden, maar de beschikbare alternatieven wettelijk nog niet gezien worden als een passend alternatief (subsidiariteit).

De DEC wordt gevraagd in haar advies de discussie rondom dilemma's, die de individuele aanvragen overstijgen en raken aan meer fundamenteel ethische vraagstukken, te benoemen. Dit kan voor de CCD aanleiding zijn om de Staatssecretaris te vragen om te komen tot een



breed gedragen maatschappelijk standpunt of het NCad te vragen, om los van individuele vergunningsaanvragen, ten algemene een advies te geven hoe om te gaan met dergelijke dilemma's.

**DEC-advies**

---

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer: AVD10300 2021 14613 / 2021-0006
2. Titel van het project: De rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1 (voorheen: Heparanase: a double-edged sword in the development of glomerulonephritis)
3. Titel van de NTS: De rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: RUDEC
  - telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 04-03-2021
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 09-03-2021
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 15-03-2021 tot 23-03-2021 / 09-04-2021 (de beantwoording in eerste instantie was niet toereikend, waardoor enkele vragen ter verduidelijking zijn gesteld)
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 23-03-2021 / 09-04-2021
  - advies aan CCD: 26-04-2021
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
  - Datum vragen: 15-03-2021
  - Datum antwoorden: 23-03-2021
  - Gestelde vragen en antwoorden:

**Project Proposal:**

-1: De titel roept vooral vragen op, en is weinig informatief. Uit de aanvraag wordt niet duidelijk wat wordt bedoeld met 'tweesnijdend zwaard'.

*Antwoord: We zijn ermee eens dat de titel inderdaad duidelijker zou kunnen. Daarom hebben we de titel aangepast naar: De rol van glomerulaire versus immuuncellen en hun dynamische wisselwerking in de toename van glomerulaire HPSE1.*

-3.1: Een duidelijke introductie van de diermodellen ontbreekt nog. De commissie kan niet goed navolgen waarom u juist deze modellen voor nierontsteking heeft uitgekozen in relatie tot het uiteindelijke doel van dit (translationele) onderzoek. In de DAP wordt gesteld dat het LPS-model het meest voorkomt bij mensen, maar een onderbouwing van deze bewering (en wat u hier precies mee bedoelt) ontbreekt.

Ook in de strategiebeschrijving zouden voor- en nadelen van beide diermodellen duidelijk aan bod moeten komen. De commissie wil daarbij opmerken dat zij primair belang hecht aan validiteit van de gebruikte modellen en aan dierenwelzijn/verfijning, in mindere mate aan economische motieven.

*Antwoord: Om de diermodellen beter te introduceren is een paragraaf opgenomen met uitleg van de diermodellen en een betere onderbouwing over waarom deze diermodellen gekozen zijn. Tevens zijn de voors en tegens benoemd voor ieder diermodel.*

-3.1: Een schema / graphical abstract met alle elementen van de moleculaire mechanismen die onderzocht zullen worden (CathepsinL, TLR2/4 etc.) inclusief de rol van de ex vivo experimenten daarin zou verhelderend zijn.

*Antwoord: Een graphical abstract met alle elementen van de moleculaire mechanismen is hier toegevoegd. De zwarte receptor is hierin TLR2/4. De witte ketens zijn heparan sulfaten die worden afgebroken door HPSE1 na activatie door CTSL. Zoals kan worden gezien in de afbeelding kunnen wanneer de heparan sulfaatketens zijn weggehaald van het celoppervlak de cellen worden gesensitiseerd, ondermeer door het binden van heparan sulfaat fragmenten aan TLR2/4. Verder spelen activatie door cytokines ook een rol (welke eveneens zal worden onderzocht in de ex vivo experimenten). Tevens worden hierin de verschillende cellen (niercellen en de immuuncellen) die een rol spelen in de secretie/activatie van HPSE 1 en dus deze projectaanvraag genoemd.*

-3.4.2: Waarom worden twee diermodellen voor nierfilterontsteking onderzocht bij de experimenten A en D? Graag helder presenteren wat voor- en nadelen van de twee ontstekingsmodellen zijn. In de bijlage vermeldt u dat er weinig mensen zijn met anti-GBM antistoffen, maar het gaat er vooral om of de ontsteking/de ziekte die u op deze manier induceert een grote mate van overeenkomst vertoont met de ontsteking/het ziekteverloop bij mensen (externe validiteit). De commissie meent dat systemische LPS-toediening allerlei bijeffecten heeft die niet nier-specifiek zijn, maar mogelijk wel interfereren met de processen en parameters die u zult onderzoeken; te denken valt aan activering van het immuunsysteem en de gevolgen daarvan. Een ander model dat langzamer op gang komt en milder is voor de dieren zou een verfijning voor de dieren zijn en heeft mogelijk meer externe validiteit. Met andere woorden, uw acute diermodel lijkt minder relevant voor translatie van de resultaten naar patiënten, en sepsis is een heftig ziektebeeld met aanzienlijk ongerief voor en uitval van dieren. De commissie verzoekt u de noodzaak voor het gebruik van dit model te heroverwegen en, indien u besluit dat dit toch het meest valide model is en verdere verfijning niet mogelijk, beter te onderbouwen dat dit model absoluut noodzakelijk is voor het behalen van uw onderzoeksdoelen en bovenstaande opmerkingen en vragen van de commissie daarbij te adresseren.

*Antwoord: We begrijpen de vragen omtrent het gebruik van de twee verschillende ziektemodellen. We hebben de gevraagde voors en tegens van beide muismodellen genoemd in de strategie beschrijving. Tevens zullen we graag ingaan op de vragen van de commissie. Het is inderdaad correct dat het LPS-model systemisch is en daardoor het immuunsysteem activeert. Echter, gezien het feit dat we in dit onderzoek willen kijken wat de rol is van de niercellen versus de immuuncellen met betrekking tot HPSE1, zou dit juist een voordeel kunnen zijn van het LPS-model. Tevens is het zo dat ook in het anti-GBM-model het immuunsysteem wordt geactiveerd, maar dan in mindere mate en lokaal. Samenvattend,*

*verwachten wij niet dat de systemische bijwerkingen van het LPS-model zullen interfereren met ons onderzoek, maar eerder zullen bijdragen. Verder willen we graag benadrukken dat wat betreft ongerief het anti-GBM en het sublethale LPS geïnduceerde nierfilterontsteking model vergelijkbaar zijn.*

*Wat betreft de externe validiteit van het LPS-model versus het anti-GBM-model zijn zij beide even relevant aangezien beide modellen de meest belangrijke karakteristieken vertonen die behoren bij nierfilterontsteking, wat is toegevoegd in de introductie:*

*Het induceren van nierfilterontsteking kan op verschillende manieren. Aangezien nierfilterontsteking bij mensen gekarakteriseerd wordt door de influx van immuun cellen, proteïnurie en verslechterde nierfunctie zijn dit belangrijke symptomen die aanwezig moeten zijn in het ziektemodel. In dit onderzoek willen we daarom gebruik maken van het LPS-model en het anti-GBM-model.*

-3.4: Uit de informatie in DAP4 blijkt dat u de sensitatie van cellen (deels?) ook zult onderzoeken met de *in vivo* experimenten. Kunt u het verband tussen (de vergelijking van) de resultaten van de verschillende *ex vivo* deel experimenten en de vraagstelling helderder opschrijven? De beschrijving van deze experimenten is ook in de DAPs erg summier, waardoor het lastig is na te volgen hoe deze experimenten bijdragen aan het inzicht dat u beoogt. Ook wordt niet toegelicht waarom u daar zowel beenmergcellen als peritoneale macrofagen voor nodig heeft, terwijl dit wel consequenties heeft voor het aantal benodigde dieren en bijkomend ongerief. Wellicht zou u daar al een keuze in kunnen maken op grond van een pilotexperiment? Dergelijke strategische keuzes zouden in dit onderdeel helder toegelicht moeten worden.

*Antwoord: het verband tussen (de vergelijking van) de resultaten van de verschillende ex vivo deel experimenten en de vraagstelling zijn helderder opgeschreven in 3.4.3:*

*Verwacht wordt dat HPSE1 gemedieerde sensitatie ook in vivo plaats vindt. Deze in vivo HPSE gemedieerde sensitatie zal worden bestudeerd door de immuun cellen en nier cellen te analyseren van knock-out/chimera knock-out versus wild-type muizen (ondermeer door het bestuderen van de in vivo response en HS-expressie) en deze resultaten te vergelijken met de data uit de ex vivo sensitatie experimenten. Samen zullen de ex vivo en in vivo resultaten van de experimenten A, B en C een beter inzicht geven in het mechanisme van HPSE1 gemedieerde sensitatie.*

*Verder is er toegelicht waarom er zowel beenmergcellen als peritoneale macrofagen gebruikt zullen worden:*

*Uit beenmergcellen zullen ex vivo neutrofielen worden geïsoleerd en de beenmergcellen kunnen worden gedifferentieerd naar verschillende type macrofagen en dendritische cellen. Vervolgens zullen al deze cellen worden gesensitiseerd met recombinant HPSE1 en daaropvolgend een andere stimuli zoals TNF $\alpha$  of LPS ontvangen. Aangezien beschreven is dat uit beenmergcellen gedifferentieerde macrofagen minder gevoelig kunnen zijn voor stimuli in vergelijking met mature macrofagen in perifere weefsels en het fenotype van de verschillende macrofagen ook anders is (19), willen we ook peritoneale macrofagen testen. Samenvattend kunnen we vanuit de beenmergcellen verschillende soorten cellen verkrijgen/differentiëren, wat de relevantie groter maakt. Echter, zoals aangegeven is specifiek voor macrofagen, de peritoneale macrofagen een gevoeliger celtype. Tevens is de HPSE1 gemedieerde sensitatie in wild-type peritoneale macrofagen aangetoond en nog niet in beenmerg gedifferentieerde macrofagen.*

### **Description of Animal Procedures:**

#### **\*DAP1**

-A1: Als primaire uitleesparameter voor cellulaire sensitisatie wordt genoemd 'HPSE1 gemedieerde sensitisatie na ex vivo incubatie etc.' Dit is geen primaire uitleesparameter, maar de omschrijving van het ex vivo experiment. Wat wordt er gemeten in dat experiment?

*Antwoord: Om duidelijk te beschrijven wat er precies gemeten zal worden in de ex vivo sensitisatie experimenten is het volgende toegevoegd:*

#### *Ex vivo HPSE1 gemedieerde sensitisatie:*

*Pre-incubatie van immuun cellen zoals neutrofielen en macrofagen met recombinant HPSE1 (eventueel ook met HS) gevolgd door een tweede stimulus zoals TNF- $\alpha$  of LPS. Vervolgens zal gemeten worden:*

- Activatie markers met IF en flow cytometrie
- mRNA expressie waarden van ontstekingsmarkers
- Cytokine response met ELISA
- HS-expressie op het cel oppervlak

-A2: Dit project richt zich op het voorkomen van nierschade. Is het strikt noodzakelijk om voor alle groepen bij het anti-GBM-model een extra tijdstip te hanteren voor het meten van granulocyten en macrofagen influx (2 uur)? Hierdoor zijn tweemaal zoveel dieren nodig (en tweemaal zoveel van het dure/zeldzame antilichaam?). Waarom is dit 2 uur tijdstip bij het LPS-model niet nodig?

*Antwoord: In tegenstelling tot wat wordt gesuggereerd richt dit project zich niet enkel op nierschade. Nierschade is natuurlijk een grote speler en een van de grootste uitleesparameters. Echter, in dit project willen we onderzoeken wat de relatieve bijdrage is van nier cellen versus immuun cellen met betrekking tot HPSE1. Het is daardoor ook van belang om te kunnen bestuderen hoe het immuunsysteem reageert. Gezien het anti-GBM model bestaat uit 2 fases: de eerste fase gaat gepaard met granulocyten influx welke piekt bij 2 uur en in de tweede fase ontstaat nierschade welke al na 96 uur meetbaar is. Voor het LPS-model is dit niet nodig aangezien bij 48 uur voldoende informatie kan worden verkregen met betrekking tot immuun cel influx in de nier.*

-D2: Dieren worden in IVC kooien gehuisvest om infecties te voorkomen (en ze krijgen antibiotica om eventuele infecties te bestrijden). De IVC-bakken hangen in rekken, en kunnen daarom niet op een warmtemat gezet worden (nadat de dieren een sublethale dosis LPS of anti-GBM serum hebben gekregen). Hoe zult u zorgen voor een warme plek in de kooien? Daarnaast is niet duidelijk of het voorkomen van infecties geen rol meer speelt bij de huisvesting in metabole kooien. Graag toelichten.

*Antwoord: Bedankt voor het opmerken dat het niet mogelijk is om de kooi te verwarmen aangezien de IVC bakken in rekken hangen. Echter, er wordt verwacht dat de muizen wanneer het zieke model wordt gestart voldoende hersteld zijn van de beenmergtransplantatie en het dan niet meer nodig is om de muizen in IVC bakken te huisvesten. Na overleg met de IvD is besloten dat indien het toch nodig blijkt om de dieren tijdens de behandeling in IVC bakken te huisvesten, dat de IVC bakken tijdelijk (in de meest kritische periode) op warmte matten geplaatst worden.*

*Met betrekking tot de metabole kooien: Hierbij is het voorkomen van infecties niet meer van belang aangezien de muizen dan al volledig hersteld zijn van de beenmergtransplantatie.*

-H: Er is nee aangekruist op de vraag of dieren pijn zullen hebben, maar de commissie vermoedt dat met name de dieren in het LPS-model wel pijn zullen ervaren. Er is vervolgens wel aangekruist dat er pijnbestrijding wordt toegepast, maar een beschrijving van verlichtende methoden en maatregelen ontbreekt. Graag een helder en consistent antwoord op de vragen van dit onderdeel.

*Antwoord: In overleg met de IvD hadden we besloten dat de dieren geen pijn zullen ondervinden. De dieren zullen dus ook geen pijnbestrijding krijgen. Echter, voordat het document naar IVB was gestuurd, hadden we wel pijnbestrijding ingevuld. Helaas blijft dit nu na aanpassing onduidelijk in inventieless staan.*

-J: Bij A ontbreekt het wegen van de dieren, terwijl er wel een humaan eindpunt op basis van het gewicht van de dieren is geformuleerd. Graag opschrijven wanneer de dieren gewogen worden.

De totaalscore die wordt gehanteerd voor het toepassen van een humaan eindpunt lijkt vrij hoog. Kunt u toelichten waarom het nodig is om dieren met score 4 nog in het experiment te laten? Criteria voor humane eindpunten kunnen zodanig aangepast worden dat onnodig ongerief voor de dieren wordt vermeden.

*Antwoord: Het wegen van de muizen is toegevoegd bij A.*

*Met betrekking tot de totaalscore die gehanteerd wordt in de humane eindpunten, is dit de standaard criteria voor humane eindpunten die wij toepassen bij dierexperimenten en in de afgelopen jaren altijd gebruikt hebben in onze DEC aanvragen na overleg met de IVB. Verondersteld wordt dat de muizen met een totaalscore van 4 nog niet het humane eindpunt hebben bereikt.*

-K: Is het cumulatief ongerief goed ingeschat voor dieren die beenmergtransplantatie + LPS krijgen? Zijn de dieren nog niet volledig hersteld van de beenmergtransplantatie op het moment van de LPS-injectie, waardoor de impact daarvan groter is bij deze dieren (ten opzichte van dieren zonder beenmergtransplantatie)? Het ondergaan van twee handelingen die elk matig ongerief veroorzaken (en veel hersteltijd daartussen) leidt niet automatisch tot ernstig ongerief voor de dieren. Graag in overleg met de IvD opnieuw inschatten.

*Antwoord: In overleg met de IvD is besloten dat de muizen inderdaad voldoende hersteld zullen zijn van de beenmergtransplantatie dus dat het cumulatief ongerief daardoor lager zal zijn.*

\*DAP2

- De commissie verzoekt u na te gaan welke vragen en opmerkingen over DAP1 (of de strekking daarvan) ook relevant zijn voor deze DAP en die te beantwoorden.

*Aanpassingen uit andere DAPs die betrekking hebben op deze DAP zijn identiek aangepast.*

-A: Zijn de bovenste drie primaire uitleesparameters van toepassing op deze DAP?

*Antwoord: Excuses, de uitleesparameters waren niet duidelijk beschreven. Dit is aangepast:*

*Pre-incubatie van immuun cellen zoals neutrofielen en macrofagen met recombinant HPSE1 (eventueel ook met HS) gevolgd door een tweede stimulus zoals TNF- $\alpha$  of LPS. Vervolgens zal gemeten worden:*

- Activatie markers met IF en flow cytometrie*
- mRNA expressie waarden van ontstekingsmarkers*
- Cytokine response met ELISA*
- HS-expressie op het cel oppervlak*

-B: Zou u de berekeningen van de benodigde aantallen dieren en het aantal dieren met ongerief dat u hier dient te vermelden willen controleren? Om 112 dieren over te houden bij 20% uitval heeft u niet 134 dieren maar 140 dieren nodig;  $80 + 134 = 214$  (ipv 114). Graag in samenspraak met de IvD bepalen welke dieren hier geteld moeten worden.

*Antwoord: In overleg met de IvD was besloten dat alle muizen die benodigd zijn voor de fok geteld moeten worden aangezien deze DAP een fok met ongerief betreft. De berekeningen zijn aangepast en verder doorgevoerd op andere plaatsen zoals het totaal aantal dieren in de NTS:*

*Aangezien er verwacht wordt dat er maximaal 20% uitval zal zijn, zullen er dus maximaal  $1.25 \times (80+112) = 240$  muizen nodig zijn.*

*Daarom vragen wij 240 muizen aan voor de fok waarvan 48 muizen zullen worden gebruikt in experimenten.*

-I: Kunt u het verloop van de afwijkingen in de tijd duidelijker omschrijven? De commissie kan het ongerief voor de dieren nu niet goed navolgen. Er zullen ook dieren van 8-10 weken oud worden gebruikt, maar in hoeverre zij al last kunnen hebben van ontstekingen is onduidelijk.

*Antwoord: Het verloop van de afwijkingen in de tijd is duidelijker beschreven in de DAP.*

-I3: Wanneer de dieren ontstekingen hebben ontwikkeld is het te laat om preventieve maatregelen te nemen. Het zou wellicht beter zijn om de dieren preventief in IVC-bakken te huisvesten.

*Antwoord: Met betrekking tot de huisvesting preventief in IVC-bakken, dit is inderdaad de bedoeling. Dit is nu duidelijker verwoord in de DAP.*

-J: De overige tekst van deze DAP wekt de indruk dat de dieren niet zo oud zullen worden dat er oogproblemen zullen ontstaan. Bij welk percentage van de dieren verwacht u een humaan eindpunt te moeten toepassen (dus exclusief de dieren die overlijden voor het spenen)?

*Antwoord: Exclusief de dieren die overlijden voor het spenen verwachten we dat bijna geen muizen (tussen de 0-1%) het humane eindpunt bereiken op basis van onze eerdere onderzoeken.*

-K: Het ongerief voor al dan niet blinde dieren met vertroebelde en/of ontstoken ogen of met bloederige plekken/wonden op de huid (de geformuleerde humane eindpunten) lijkt eerder matig dan licht. Hoe kunt u garanderen dat dieren uit de proef gehaald worden voordat het ongerief matig wordt? Indien de dieren lang blijven zitten waardoor zij meer ongerief krijgen, dan graag uitleggen waarom u dat nodig acht.

*Antwoord: Mochten de muizen zover komen dan zal dit ongerief inderdaad onder matig kunnen vallen. Echter, gaan wij ervanuit dat vrijwel geen van de muizen deze symptomen zo ernstig zal ontwikkelen binnen 8 tot 10 weken en daardoor hebben we het ongerief ingeschaald als licht. Ervanuit gaande dat minder dan 1% van de dieren wellicht wel dit ongerief zullen ondergaan, hebben we dit nu aangepast in de DAP.*

\*DAP3

- De commissie verzoekt u na te gaan welke vragen en opmerkingen over DAP1 (of de strekking daarvan) ook relevant zijn voor deze DAP en die te beantwoorden.

*Aanpassingen uit andere DAPs die betrekking hebben op deze DAP zijn identiek aangepast.*

- Heeft u voldoende anti-GBM serum om alle in deze projectaanvraag beschreven experimenten uit te voeren? Er worden geen dieren aangevraagd om meer anti-GBM serum te produceren.

*Antwoord: Er is momenteel nog voldoende anti-GBM-konijnserum voor de deelexperimenten waarbij anti-GBM noodzakelijk is (deelexperiment C en het pilot experiment van deelexperiment D).*

\*DAP4

- De commissie verzoekt u na te gaan welke vragen en opmerkingen over DAP1 (of de strekking daarvan) ook relevant zijn voor deze DAP en die te beantwoorden.

*Antwoord: Aanpassingen uit andere DAPs die betrekking hebben op deze DAP zijn identiek aangepast.*

-A2: Het lijkt alsof u van plan bent beide nierfilterontstekingsmodellen in te zetten, ongeacht de resultaten met het LPS-model (hoewel bij de opsomming van de deelgroepen het anti-GBM-model optioneel wordt genoemd). De commissie gaat er vanuit dat de keuze voor het model al is gemaakt na het uitvoeren van de experimenten van DAP1. Graag de aantallen dieren bij B aanpassen, aangezien u nooit beide modellen zult uitvoeren maar daar bij de berekening van de aantallen dieren wel rekening mee houdt.

*Antwoord: Aangezien wij niet 1 van de 2 ziektemodellen bij voorbaat volledig willen uitsluiten, maar inderdaad niet van plan zijn om beide ziektemodellen volledig te doen, is besloten om de muizen te tellen voor beide pilots en het maximaal aantal te gebruiken muizen om 1 diermodel uit te voeren. Dit is aangepast.*

-D2: De tekst graag toespitsen op de experimenten in deze DAP. Beenmergtransplantatie is hier niet aan de orde.

*Antwoord: De tekst is goed doorgespit om tekstuele fouten die niet in deze DAP horen eruit te halen. Er is één zin gevonden over beenmergtransplantatie en deze is verwijderd.*

#### **Niet-technische samenvatting:**

-3.1: Deze tekst bevat (te) veel detail en technische termen voor de doelgroep.

*Antwoord: De tekst is aangepast, een aantal details en technische termen zijn verwijderd.*

-U wordt verzocht na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

*Antwoord: Aanpassingen uit PP en DAPs die betrekken hebben op de NTS zijn aangepast: totaal aantal dieren van 1444 naar 1390.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. Er waren echter nog een aantal onduidelijkheden. Er zijn nog vragen gesteld.

Correspondentie met de aanvrager:

- Datum vragen: 01-04-2021

- Datum antwoorden: 09-04-2021

- Gestelde vragen en antwoorden:

- Klopt het dat de voorkeur eigenlijk uitgaat naar het LPS-model omdat nierfalen bij sepsis veel voorkomt en anti-GBM geïnduceerd nierfalen zeldzaam is (in DAP1 wordt gestart met het LPS-model, pas wanneer de resultaten niet goed te interpreteren zijn wordt het anti-GBM-model gebruikt)? Daarbij komt dat voor het LPS model de helft van het aantal dieren



nodig is, maar dat wordt niet als argument genoemd (terwijl dit wel een belangrijk argument zou zijn).

*Antwoord: Het klopt inderdaad dat onze voorkeur uitgaat naar het LPS-model, om meerdere redenen. Zoals genoemd in de inleiding van de PP waar de voor- en tegenargumenten voor beide modellen worden besproken zijn er inderdaad dubbel zo veel dieren nodig voor het anti-GBM-model dan voor het LPS-model. Tevens hebben we het argument dat er minder dieren nodig zijn voor het LPS model in vergelijking met het anti-GBM model benoemd in de DAP onder het kopje vermindering:*

*“We zullen met het LPS model beginnen doordat het LPS model vaker voorkomt in patiënten terwijl het anti-GBM model uiterst zeldzaam is in patiënten en daarmee het LPS model dus relevanter voor de humane situatie. Tevens zijn voor het anti-GBM model meer dieren nodig doordat er twee tijdpunten moeten worden meegenomen en door het gebruik van anti-GBM konijn IgG waarvoor voor een gemiddelde batch 200 muizen en 20 konijnen benodigd zijn die behalve verschillende injecties ook perfusie moeten ondergaan en daardoor ongerief ondervinden (er is momenteel nog een kleine (maar voldoende) hoeveelheid anti-GBM konijn IgG beschikbaar, echter willen we hier door voorgenoemde redenen zuinig mee zijn).”*

- Een ander voordeel van het LPS model zou kunnen zijn dat de mate van sepsis doseerbaar is (in het project is sprake van milde sepsis). Dit heeft wel gevolgen voor de DAP, er moet dan een LPS- dosis afhankelijkheid getest worden dan wel keuze voor een dosis uitgelegd worden.

*Antwoord: Het is correct dat er milde sepsis zal worden geïnduceerd. Echter, we hebben in ons lab al veel ervaring met het induceren van LPS geïnduceerde nierfilterontsteking (benoemd als milde sepsis), ook met deze muizen waardoor we al weten welke dosis we moeten injecteren. Dit is nogmaals benadrukt door de volgende tekst toe te voegen aan de DAP bij animal procedures: Zowel met het LPS als voor het anti-GBM model hebben wij al ervaring met de specifieke muis die gebruikt zal worden, waardoor wij de dosis van LPS en anti-GBM die gebruikt moet worden weten.*

- In de aan de introductie toegevoegde tekst wordt vermeld dat influx van immuuncellen, proteïnurie en verslechterde nierfunctie belangrijke symptomen zijn van nierfilterontsteking bij mensen. Hier verwijst u naar bij de beantwoording van de vraag naar de externe validiteit van de gekozen diermodellen. Het is onduidelijk in hoeverre er in de beide diermodellen ook in vergelijkbare mate sprake is van verslechterde nierfunctie: hoe wordt dit gemeten? De tekst over de externe validiteit van beide modellen is zonder verdere onderbouwing/uitleg niet goed navolgbaar.

*Antwoord: Zowel het LPS model als het anti-GBM model zijn in de literatuur geaccepteerde modellen voor het induceren van nierfilterontsteking. Nierfilterontsteking leidt hierin tot verslechterde nierfunctie welke kan worden gemeten door de creatinine waarden te meten in het bloed, en in de urine van de muizen door het meten van albumine en creatinine (hiervoor zullen de muizen in metabole kooien worden gehuisvest de laatste dag van het experiment). Aan de tekst over de externe validiteit in de PP is een stuk toegevoegd:*

**Beide modellen gaan gepaard met de belangrijkste karakteristieke van nierfilterontsteking in de humane situatie: 1. influx van immuuncellen (welke gemeten zullen worden door IF kleuringen en/of**

ELISA) 2. Proteïnurie (welke gemeten zal worden door het bepalen van de albumine en creatinine waardes in de urine van de muizen) en 3. verslechterde nierfunctie die gemeten zal worden door creatinine te meten in het bloed.

- De legenda bij het graphical abstract is incompleet, waardoor de illustratie lastig te begrijpen is. Graag alle cijfers en afkortingen uitleggen in de legenda, inclusief de aard van de targetcel.

*Antwoord: De legenda is aangepast:*

- Wat betreft de *ex-vivo* sensitisatie-experimenten: het gegeven antwoord lijkt te impliceren dat peritoneale macrofagen superieur zijn. Waarom worden dan ook gedifferentieerde beenmergcellen onderzocht? Hier zijn extra dieren voor nodig, maar nut en noodzaak van de experimenten met gedifferentieerde beenmergcellen zijn nu niet duidelijk beschreven. Ook is gevraagd of een keuze gemaakt zou kunnen worden op grond van een pilotexperiment, maar die vraag lijkt niet beantwoord. Als uit zo'n pilot blijkt dat er geen HPSE1-gemedieerde sensitisatie optreedt bij uit beenmerg gedifferentieerde macrofagen, dan zou dit onderzoek alleen met peritoneale macrofagen uitgevoerd hoeven worden (go / no go beslissing op basis van een pilot). Graag alsnog beantwoorden.

*Antwoord: Op basis van de literatuur blijkt dat peritoneale macrofagen een sterkere response geven op stimuli dan beenmerg gedifferentieerde macrofagen. Echter, zoals beschreven in de vorige reactie en toegevoegd aan de PP is het zo dat cellen die verkregen worden/gedifferentieerd worden uit beenmerg meer divers zijn:*

*Uit beenmergcellen zullen ex vivo neutrofielen worden geïsoleerd en de beenmergcellen kunnen worden gedifferentieerd naar verschillende type macrofagen en dendritische cellen. Vervolgens zullen al deze cellen worden gesensitiseerd met recombinant HPSE1 en daaropvolgend een andere stimuli zoals TNFa of LPS ontvangen. Aangezien beschreven is dat uit beenmergcellen gedifferentieerde macrofagen minder gevoelig kunnen zijn voor stimuli in vergelijking met mature macrofagen in perifere weefsels en het fenotype van de verschillende macrofagen ook anders is (19), willen we ook peritoneale macrofagen testen. Het zijn dus additionele experimenten aangezien er zoals hierboven beschreven gekeken kan worden naar andere celtypes. Echter, hebben de voorgestelde go/no go op basis van een pilot toegevoegd aangezien we inderdaad niet alle muizen gaan injecteren of het beenmerg isoleren als uit de pilot ex vivo experimenten blijkt dat sensitisatie uitblijft. Dit is toegevoegd in de PP:*

- Zijn CTSL-/- muizen die een beginnende ontsteking hebben nog wel bruikbaar voor de *ex-vivo* experimenten? De immuuncellen van deze dieren zijn immers mogelijk al geactiveerd door de ontsteking, waardoor dit de uitkomst van de experimenten kan beïnvloeden. Graag heroverwegen of dieren met beginnende ontstekingen al uit de proef gehaald zouden moeten worden (extra wetenschappelijk eindpunt omdat het doel van de proef niet meer behaald kan worden).

*Antwoord: Er is gekozen om de muizen met beginnende ontstekingen inderdaad uit de proef te halen. Dit eindpunt is toegevoegd in de DAP.*

- Uw antwoord over de beschikbaarheid van voldoende anti-GBM-antistoffen is niet

compleet. Wat gaat u doen als blijkt dat het LPS-model niet volstaat om tot een conclusie te kunnen komen met betrekking tot de onderzoeksvraag en uw huidige hoeveelheid anti-GBM-antistoffen niet volstaat voor afronding van het onderzoek? U dient aan te geven hoeveel antistof beschikbaar moet zijn om een statistisch verantwoord experiment uit te kunnen voeren. De haalbaarheid van het project is nu niet goed in te schatten door de commissie.

*Antwoord: Voor het indienen van de onderzoek aanvraag is de hoeveelheid anti-GBM die maximaal benodigd is uitgerekend en gecontroleerd of er nog voldoende aanwezig is. Dit is het geval. Dus de hoeveelheid die nu aanwezig is, is niet limiterend voor het project.*

- In andere projectaanvragen wordt de procedure voor het opwekken van macrofagen in de buikholte met thioglycolaat als matig ongerief ingeschat. Wijkt uw protocol af van doorgaans gebruikte protocollen, waardoor u het ongerief voor de dieren inschat als licht in plaats van matig? Eventueel in overleg met de IvD de ongeriefinschatting aanpassen of onderbouwen waarom het als licht ongerief is ingeschat.

*Antwoord: Bedankt voor het wijzen hierop. Wij waren hiervan niet op de hoogte en aangezien wij dit gewoon volgens standaard protocol doen, is in overleg met de IvD besloten om inderdaad deze ongeriefinschatting te veranderen van licht naar matig. Dit is ook aangepast in de classificatie van het ongerief van de experimenten A, B en C in de DAP.*

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

#### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

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

#### **C. Beoordeling (inhoud)**

1. Deze aanvraag richt zich op de rol van heparanase 1 (HPSE1) bij het ontstaan van schade aan het nierfilter door nierfilterontsteking bij diermodellen voor nierfilterontsteking, en de rol van nier- en immuuncellen (en de wisselwerking tussen deze cellen) hierbij. Het onderzoek is onderverdeeld in vier deelexperimenten waarin respectievelijk de rol van HPSE1 expressie in niercellen en/of immuuncellen, de rol van CTSL expressie, de rol van TLR2/4 in niercellen en/of immuuncellen, en het effect van systemische of celspecifieke HPSE1 remming op het ontstaan van nierschade in diermodellen voor nierfilterontsteking wordt onderzocht. De deelexperimenten worden met verschillende knock-out muizenstammen uitgevoerd, waarbij gekeken wordt naar proteinurie, nierfunctie, histologie van het nierweefsel, HPSE1 activiteit, ontstekingsmarkers (cytokines, mRNA expressie van eiwitten betrokken bij ontsteking, influx van immuuncellen), en overige activatiemarkers voor immuuncellen (cytokineproductie, HS-expressie op het celoppervlak). Parallel aan de *in vivo* experimenten zullen *ex vivo* experimenten met uit beenmergcellen gedifferentieerde en met mature macrofagen worden uitgevoerd, waarin het mechanisme dat leidt tot de sensitatie van immuuncellen zal worden onderzocht. Wanneer met het LPS-model genoeg en eenduidige informatie kan worden verkregen met betrekking tot de onderzoeksvraag, dan zal het anti-GBM-model niet gebruikt worden. Eén van de deelexperimenten kan echter alleen uitgevoerd worden met het anti-GBM-model. De commissie

constateert op grond daarvan dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de 'Handreiking invulling definitie project'. De verschillende deelexperimenten/subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid en zij tezamen een geïntegreerd begrip van de rol van HPSE1 en van nier- en immuuncellen en de wisselwerking daartussen geven bij het ontstaan van schade aan het nierfilter door nierfilterontsteking. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De experimenten zullen zowel mechanistisch inzicht opleveren in de processen die een rol spelen bij het ontstaan van schade aan het nierfilter bij nierfilterontsteking (basaal wetenschappelijk onderzoek), als inzichten die kunnen leiden tot de ontwikkeling van interventies die (verergering van) schade aan het nierfilter van mensen met een nierfilterontsteking kunnen tegengaan (toegepast onderzoek).

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is het bestuderen van de dynamische wisselwerking tussen nier- en immuuncellen en het mechanisme dat leidt tot HPSE1 gemedieerde sensitivatie van nier- en immuuncellen in diermodellen voor nierfilterontsteking. Op basis van de verkregen resultaten zullen twee nieuwe therapieën voor mogelijke remming van HPSE1 worden uitgetest om schade aan het nierfilter te verminderen en/of te voorkomen. Het uiteindelijke doel is bij te dragen aan de ontwikkeling van een effectieve therapie voor mensen met nierfilterontsteking (de ontsteking leidt tot proteïnurie) zodat nierschade voorkomen of verminderd kan worden. De onderzoekers maken gebruik van twee diermodellen voor nierfilterontsteking: het LPS-model en het anti-GBM model, die beide belangrijke voordelen hebben maar ook nadelen. De onderzoekers zijn van mening dat het LPS-model meer lijkt op de situatie in de kliniek waar sepsis geïnduceerd nierfalen vaak voorkomt bij mensen op de IC. Het LPS-model is relatief kortdurend en in tegenstelling tot het anti-GBM model kan volstaan worden met een analyse 48 uur na inductie van de schade, terwijl in het anti-GBM model op twee tijdstippen analyse plaatsvindt waardoor twee keer zoveel dieren nodig zijn. Indien mogelijk maken zij daarom zoveel mogelijk gebruik van het LPS-model. Echter bij het onderzoek naar de rol van de TLR2/4 kan het LPS-model niet gebruikt worden omdat TLR2/4 de receptor is voor LPS. Het LPS-model geeft geen ontsteking in nieren van TLR2/4 deficiënte dieren, waardoor gebruik van het GBM-model dan meer voor de hand ligt. Het is aannemelijk dat in mensen en muizen dezelfde processen en mechanismen een rol spelen bij nierfilterontsteking en het ontstaan van nierschade, waardoor het ook aannemelijk is dat therapieën die ontwikkeld worden op basis van de resultaten van dit onderzoek werkzaam zullen kunnen zijn bij mensen. Dergelijke therapieën dienen wel eerst uitgetest te worden in klinisch onderzoek voordat ze op grote schaal toegepast kunnen worden bij mensen met chronische nierziekten/proteïnurie. Er is daarom binnen deze aanvraag wel een reële maar geen

directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van cellen en processen die een rol spelen bij HPSE1 gemedieerde sensitisatie in nierfilterontsteking nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor mensen met nierfilterontsteking cq. proteïnurie, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen om progressie tot nierfalen en afhankelijkheid van niervervangende therapieën (dialyse, niertransplantatie) te voorkomen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

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

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast (zie C11 en C12). De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor de wetenschappelijke gemeenschap is dit onderzoek van belang, onder meer omdat het basale kennis zal opleveren over effecten van het sensibiliseren van immuuncellen en niercellen. Andere onderzoekers die zich richten op immuuncellen of niercellen kunnen deze kennis gebruiken in hun eigen onderzoek, waardoor uiteindelijk de kennis over de functie van deze cellen zal toenemen. De commissie acht het vergroten van wetenschappelijke kennis van substantieel belang.

Voor patiënten is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van betere diagnostiek en/of nieuwe behandelingen voor chronische nierziekten/proteïnurie. Gerichtte behandeling op basis van mechanistisch inzicht in cellen en processen die een rol spelen bij het ontstaan van onomkeerbare schade aan het nierfilter kan bijdragen aan accuratere diagnostiek en een effectievere behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt minder snel afhankelijk wordt van niervervangende therapieën. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor chronische nierziekten, is van groot belang voor de samenleving.

6. De aanvrager maakt geen melding van onbedoelde nadelige effecten op het milieu. Er is geen aanleiding voor de DEC om te verwachten dat die er zullen zijn.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager heeft zeer veel ervaring met onderzoek op het gebied van nierfalen. Ook heeft de onderzoeker veel ervaring met de muismodellen die in dit project zullen worden gebruikt. Het onderzoek heeft geresulteerd in tal van publicaties in goede wetenschappelijke tijdschriften. De commissie is daarom overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde, onder andere op grond van een artikel 9 kwalificatie, om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.